

PROTOPLASMA

IN VERBINDUNG MIT R. CHAMBERS UND W. SEIFRIZ
BEGRÜNDET VON FRIEDL WEBER UND JOSEF SPEK

UNTER BESONDERER MITWIRKUNG VON

J. BRACHET	N. KAMIYA	H. KINZEL	A. PISCHINGER	S. STRUGGER
BRUXELLES	OSAKA	WIEN	WIEN	MÜNSTER

HERAUSGEGEBEN VON

K. HÖFLER	E. PERNER	K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN
WIEN	HANNOVER	BONN

BAND LIII, HEFT 2
MIT 81 TEXTABBILDUNGEN
ABGESCHLOSSEN AM 2. DEZEMBER 1960



WIEN
SPRINGER-VERLAG
1961

Protoplasma

Die Zeitschrift

Protoplasma

erscheint zwanglos in einzeln berechneten Heften wechselnden Umfanges, die zu Bänden von 600 bis 650 Seiten vereinigt werden.

Die Zeitschrift veröffentlicht Originalarbeiten, kurze Mitteilungen, Sammelreferate und kritische Referate aus allen Teilen der Protoplasmaforschung. Die Abhandlungen, kurzen Mitteilungen, Sammelreferate und Referate können in den Sprachen der internationalen biologischen Kongresse verfaßt sein.

Manuskripte sowie alle auf die Redaktion bezüglichen Anfragen sind an

Prof. Dr. K. Höfler, Pflanzenphysiologisches Institut der Universität, Wien I, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, Österreich, oder

Prof. Dr. E. Perner, Botanisches Institut der Tierärztlichen Hochschule, Hannover-Kirchrode, Bünteweg 17, Westfalenhof, Deutschland, oder

Dozent Dr. K. E. Wohlfarth-Bottermann, Zentral-Laboratorium für angew. Übermikroskopie der Universität Bonn, Poppelsdorfer Schloß, Deutschland

zu senden; alle geschäftlichen Mitteilungen an den

Springer-Verlag in Wien I, Mülkerbastei 5

Fernsprecher: 63 96 14 Serie — Telegrammadresse: Springerbuch Wien.

Die Manuskripte sollen mit der Maschine geschrieben sein. Den Abhandlungen ist eine Zusammenfassung beizufügen, die Literatur ist nicht in Form von Fußnoten, sondern am Ende der Arbeit in Listenform anzuführen.

Die Manuskripte sind vollständig druckreif und in fehlerfreier Sprache einzusenden, so daß bei der Korrektur nur Satzfehler verbessert zu werden brauchen. Überschreiten die Autorkorrekturen 10% der Satzkosten, hat der Autor das Mehr zu tragen.

Die Vorlagen für die Abbildungen müssen vollkommen nachbildungsfähig abgeliefert werden. Die Abbildungen sind auf das unbedingt notwendige Maß zu beschränken. Farbige Abbildungen können nur auf Kosten des Autors angefertigt werden. Für die Reproduktion besonders reichen Illustrationsmaterials ist im Interesse der Besitzer der Zeitschrift ein Kostenbeitrag zu leisten.

Bedingung der Aufnahme von Arbeiten ist: möglichst kurze Fassung des Textes. Die Beiträge sollen im allgemeinen den Umfang von 1 1/2 Druckbogen (24 Seiten) nicht überschreiten.

„Vorläufige Mitteilungen“ und Auseinandersetzungen polemischen Inhalts werden nicht angenommen. Grundsätzlich werden nur Arbeiten aufgenommen, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind; der Autor verpflichtet sich, diese auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen. Mit der Annahme und Veröffentlichung des Manuskriptes geht das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder auf den Verlag über. Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme u. ä. von Heften der Zeitschrift, einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen. Die Autoren erhalten 100 Separata ihrer Arbeit kostenlos und können maximal weitere 100 Separata zum angemessenen Preis beziehen. Die Bestellung muß mit dem dem Fahnenabzug beigelegten Bestellzettel bei der Rücksendung der korrigierten Fahnen erfolgen.

Unkostensatz wird nur für Sammelreferate geleistet.

Der Verlag

LIII. Band

Inhaltsverzeichnis

2. Heft

Abhandlungen

Reiter, Liselotte: Viruskristalle in Nelken	149
Lamprecht, Ingrid: Die Feinstruktur der Plastiden von <i>Tradescantia albiflora</i> (Kth.) bei Eisenmangelchlorose II.	162
Pavletić, Z. und H. Lieth: Die Entwicklung von Lophocolea-Arten nach einer kurzzeitigen Plasmolysebehandlung	200
Kelbitach, H.: Crown gall an viruskranken Pflanzen	205
Moldenhauer Brooks, Matilda: Nicotine as a Redox-reducing Reagent Producing Abnormal Growth in Animal Cells	212
Oppenheimer, H. R., und B. Jacoby: Usefulness of Autofluorescence Tests as Criterion of Life in Plant Tissues	220
Masashi, Tazawa: Weitere Untersuchungen zur Osmoregulation der <i>Nitella</i> -Zelle	227
Wohlfarth-Bottermann, K. E.: Strukturaspekte der Grundsubstanz des Cytoplasmas nach Einwirkung verschiedener Fixierungsmittel	259
Arndt, E. A.: Professor Dr. Josef Speck 65 Jahre alt	291

Kurze Mitteilungen

Thaler, Irmtraud: Virus-Einschlüsse in <i>Fritillaria Meleagris</i> L.	294
Ziegler, Annemarie: Spindelförmige Inthaltkörper in den Zellen von <i>Nitophyllum</i>	298

Referate

301

Viruskristalle in Nelken*

Von

Liselotte Reiter

Aus dem Institut für Anatomie und Physiologie der Pflanzen der Universität Graz

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Juli 1960)

1. Einleitung

In Grazer Blumenhandlungen wurden im März 1959 aus Südfrankreich stammende Nelken verkauft, deren Blütenblätter durch schmale oder breitere anthocyanrote Sektoren gestreift waren. Bei Virosen treten vor allem an Blüten sehr häufig Krankheitssymptome in Form von Farbabänderungen auf (Bawden 1956).

Die Vermutung lag daher nahe, daß diese Nelken (Abb. 1) von einem Virus infiziert waren, obwohl die Pflanzen sonst keine auffallenden Krankheitssymptome aufwiesen. Der Nachweis für das Vorhandensein einer Virose läßt sich auf verschiedene Weise bringen. Abgesehen vom elektronenmikroskopischen sowie vom serologischen Nachweis können als Beweise entweder eine geglückte Übertragung der Krankheit auf gesunde Testpflanzen oder das Vorhandensein von Einschlußkörpern in den Zellen der viroseverdächtigen Pflanze gelten. Wenn Einschlußkörper (x-bodies oder kristalline Einschüsse) aufgefunden werden, so darf dies als sicherer Beweis für das Vorhandensein von Viren in den Pflanzen angesehen werden (Schmelzer 1958). Dieser Weg führt am einfachsten und raschesten zum Ziele.

In den Zellen der buntstreifigen Nelkenblüten wurden nun tatsächlich Einschlußkörper sehr verschiedener Art gefunden; darüber soll in dieser Mitteilung berichtet werden. Vorerst sei aber noch erwähnt, daß nicht nur die variegaten Blüten charakteristische Viruseinschlußkörper enthielten, sondern ebenso auch die reinweiß, rot oder gelb blühenden der gleichen Sorte, ferner neben den Nelken aus Südfrankreich auch solche, die in einer Grazer Gärtnerei kultiviert werden.

* Dem Andenken meines verehrten Lehrers Prof. Dr. Friedl Weber widme ich diese Arbeit.

Die Gartennelke *Dianthus caryophyllus* wird, wie auch andere gärtnerisch aus Stecklingen kultivierte Pflanzen, von verschiedenen Viren befallen. Bekannt sind von Nelken-Virosen das Nelkenmosaik (Carnation Mosaic), die Nelkenschekung (Carnation Mottle), das Nelkenstrichel (Carnation Streak), die Nelkenringfleckigkeit (Carnation Ringspot) und das latente Nelkenvirus (Carnation Latent Virus). Die äußerlichen Symptome sind vielfach auf Laubblatt und Stengel beschränkt und geringfügig, ja bei dem Befall mit dem Carnation Latent Virus bleiben die Pflanzen makroskopisch überhaupt „symptomlos“. Um so wichtiger schien es bei den Nelken-

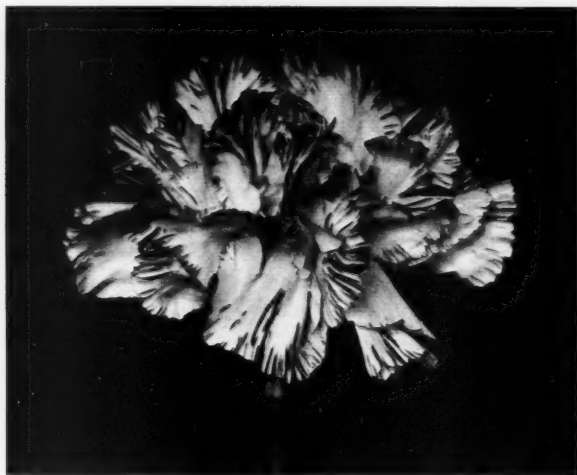


Abb. 1. *Dianthus caryophyllus*. Gestreifte Blüte.

Virosen auf das Vorkommen von inneren mikroskopischen Symptomen, nämlich von Virus-Einschlußkörpern, zu achten. Obwohl die Literatur über Nelken-Virosen (Zusammenfassung bei Köhler und Klinkowski 1954 und Smith 1957) recht umfangreich ist, verzeichnen die einschlägigen Handbuch- und Spezialarbeiten, die uns zugänglich sind, keine Angaben über Einschlußkörper in viruskranken Nelken. Das bisherige Fehlen solcher Daten rechtfertigt die Mitteilung folgender Befunde.

2. Cytologische Beobachtungen

In allen Organen der genannten Nelkensorte — mit Ausnahme der Wurzel — treten die für Virus charakteristischen Zelleinschlüsse, wie x-Körper und kristallartige Formen, in großer Mannigfaltigkeit auf. Nach den cytologischen Befunden können die mikroskopischen Symptome in zwei Gruppen geschieden werden. Neben den x-Körpern finden sich entweder hexagonale, kristallähnliche Gebilde, oftmals auch „striated bodies“, im folgenden als Gruppe I bezeichnet. In Gruppe II treten neben den x-Körpern statt der

hexagonalen tetraederähnliche Kristalle auf. „Striated bodies“ fehlen hier regelmäßig. Ob es sich dabei um den gleichen Virusstamm mit morphologisch verschiedenen Einschlußkörpern oder um zwei verschiedene Stämme handelt, soll zunächst offen bleiben. Erwähnt sei nur, daß bei Nelkenviren sehr häufig Mischinfektionen auftreten (Forsberg 1958), die die Entscheidung erschweren.

Die Epidermis der Blätter besitzt einen starken Wachsüberzug, der die Klarheit des mikroskopischen Bildes wesentlich beeinträchtigt. Dennoch konnten in den Blattepidermiszellen protoplasmatische x-Körper gefunden werden. Diese zeigen ein grobkörniges Aussehen und sind gegen das um-

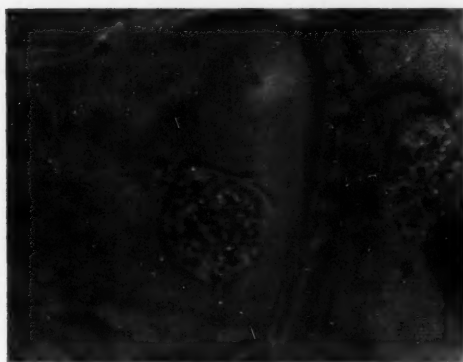


Abb. 2.



Abb. 3.

Abb. 2. *Dianthus caryophyllus*. X-Körper in Blattepidermiszelle.

Abb. 3. *Dianthus caryophyllus*. Hexagonale Kristalle in einem Trichom.

gebende Plasma scharf abgegrenzt (Abb. 2). Meist liegen sie in engster Verbindung mit dem hyalinen Zellkern. Die x-Körper sind im Blatt auf die obere und untere Epidermis und das subepidermale Chlorenchym beschränkt. In den Schließzellen der Stomata sind sie nicht zu finden. Meist sind die x-Körper in den Blattepidermiszellen von etwa gleicher Größe wie die Zellkerne, es fanden sich aber auch doppelt so große. Von den Kernen sind sie leicht durch ihr grobkörniges Aussehen zu unterscheiden. In späteren Stadien enthalten die x-Körper mehrere Vakuolen, sie sind in die Länge gezogen, und die Zahl der lichtbrechenden Körnchen ist dann wesentlich vermindert.

In Gruppe I finden sich neben den x-Körpern in Blättern, auch wenn sie äußerlich keine Symptome einer Viruserkrankung erkennen lassen, hexagonale prismatische Kristalle. Diese sind nur in den Haarzellen an der Basis der jungen Blätter anzutreffen, und zwar entweder in der Ein- oder auch Zweizahl (Abb. 3). Sind hexagonale Einschlüsse in den

Haaren zu beobachten, so fehlen dort die x-Körper. Ob diese hexagonalen prismatischen Kristalle aus den x-Körpern hervorgegangen sind, wie es von sehr vielen kristallinen Viruseinschlüssen bekannt ist (Sheffield 1939), war nicht eindeutig festzustellen. Jedenfalls konnten ein einziges Mal in einer x-body-haltigen Epidermis gefaserte Eiweißspindeln beobachtet werden. Da in den x-Körpern der Blattepidermis nie Kristallnadeln auftraten, die auf eine eventuelle Umwandlung der x-Körper zu hexagonalen Kristallen hinweisen könnten, ist es auch fraglich, ob die

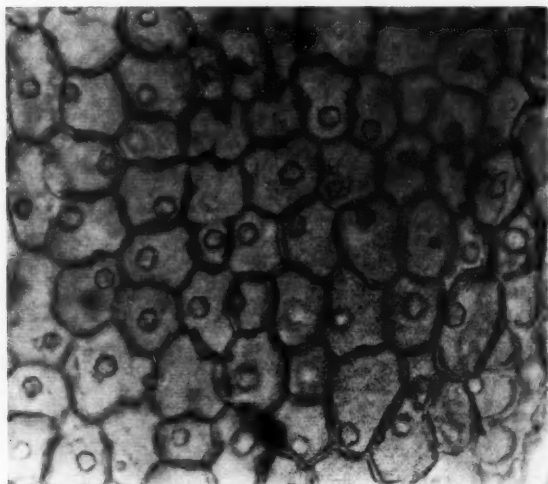


Abb. 4. *Dianthus caryophyllus*. Kronenblattepidermis. In jeder Zelle ein Viruskristall.

vorhandenen Eiweißspindeln als Zwischenstufen zwischen x-Körper und hexagonalen prismatischen Formen anzusehen sind.

Hexagonale Prismen sind als Einschlusskörper in viruskranken Pflanzen ziemlich weit verbreitet. Schon seit Iwanowski (1903) sind sie als Einschlusskörper in tabakmosaikinfizierten Pflanzen bekannt. In letzter Zeit konnten verschiedene Autoren, u. a. Steere und Williams (1953) sowie Brandes (1956) an isoliertem Prismenmaterial und an Ultradiünnschnitten aus TMV-infizierten Pflanzen zeigen, daß diese Kristalle aus TMV-Partikeln bestehen.

Ein massenhaftes Auftreten der hexagonalen, prismatischen Kristalle ist in der Blütenepidermis von *Dianthus caryophyllus* nachzuweisen (Abb. 4). Obwohl in der Epidermis der Kronblätter auch x-Körper anzutreffen sind, so überwiegen als Einschlüsse in der Blüte doch die Kristalle; wie im Blatt sind x-Körper und Kristalle nie zusammen in einer Zelle anzutreffen.

Die hexagonalen, prismatischen Kristalle der Kronblattepidermiszellen gleichen denen in den Haarzellen der Blätter, die x-Körper in der Blütenepidermis sind zum Unterschied von den Blatt-x-Körpern unregelmäßig

begrenzt (Abb. 5), sehr feinkörnig und unterscheiden sich, wie weiter unten gezeigt wird, auch in chemischer Hinsicht voneinander. Das Auftreten der

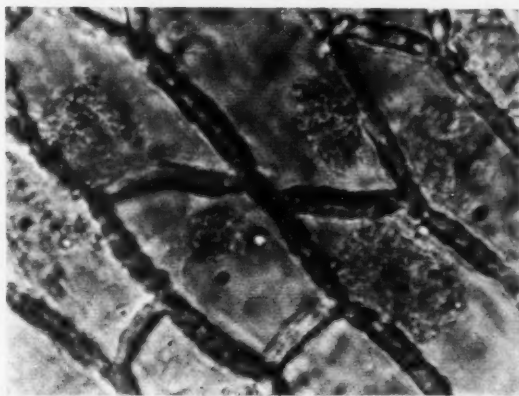


Abb. 5. *Dianthus caryophyllus*, X-Körper aus der Kronblattepidermis.

x-Körper in den Kronblättern beschränkt sich größtenteils auf die langen Epidermiszellen des Nagels, vereinzelt sind sie auch in der Platte des Kron-

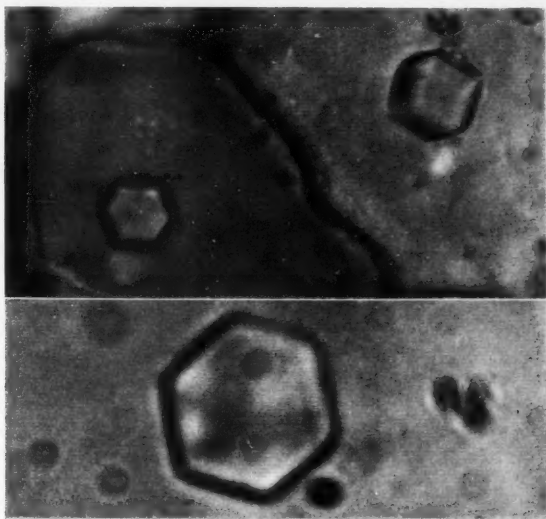


Abb. 6. *Dianthus caryophyllus*, Viruskristalle aus dem Kronblatt in verschiedener Stellung.

blattes anzutreffen. Die Kristalle dagegen treten in der ganzen Kronblatt-epidermis fleckenweise auf, aber nur selten in den Epidermiszellen des

Nagels. In der Aufsicht besitzen sie eine hexagonale Form, in Profilstellung eine rechteckige (Abb. 6). Oft liegen zwei oder drei in einer Zelle. Im polarisierten Licht erweisen sie sich als doppelbrechend. Sie sind noch unbeständiger als die x-Körper; schon bei längerem Liegen in Wasser zerfallen sie in ein körniges Aggregat; durch Säuren und Alkalien werden sie vollständig aufgelöst.

Die hexagonalen Kristalle von *Dianthus caryophyllus* zeigen sehr große Ähnlichkeit mit den in neuerer Zeit von Wehrmeyer (1959) lichtmikro-

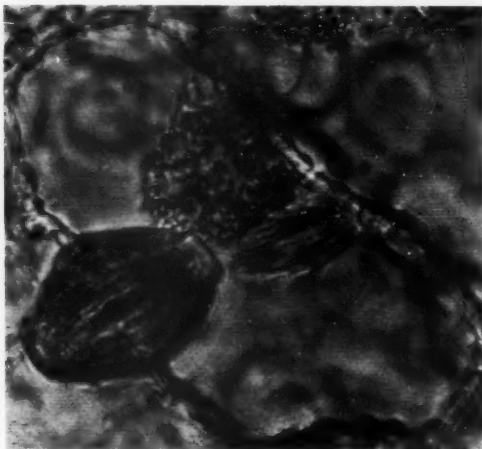


Abb. 7. *Dianthus caryophyllus*, Blattepidermiszelle. Im engsten Zusammenhang mit dem x-body liegt ein gestreifter Körper.

skopisch und elektronenmikroskopisch untersuchten hexagonalen Prismen in TMV-infizierten Pflanzen. Von Nelkenviren wurden schon früher das Carnation Ringspot Virus (Noordam, Thung und van der Want 1951) und das Carnation-Mosaic-Virus auf Grund ihrer Eigenschaften mit der Gruppe der Tabaknekroseviren in Zusammenhang gebracht. Kassanis (1955) konnte aber zeigen, daß sich das Carnation-Ringspot-Virus in vielen Merkmalen von den Tabaknekroseviren unterscheidet.

Nelkenpflanzen mit deutlichen Flecken an den Blättern hatte ich erst im Februar 1960 erhalten. Es handelte sich um eine rotblühende Pflanze, die an den älteren Blättern rundliche, braune, nekrotische Flecken zeigte. Unter dem Mikroskop erwiesen sich die Epidermiszellen im Zentrum der Flecken als tot und von einer braunen, granulären Masse vollständig erfüllt. Daran grenzen zwei bis drei Zellreihen, die regelmäßig Viruseinschlußkörper besitzen. Es sind dies sehr große granuläre x-bodies, die oft den halben Zellraum ausfüllen. Außerdem liegen neben den x-Körpern gestreifte Körper (Abb. 7 und 8). Offenbar gehen diese aus den x-bodies hervor, denn sie liegen entweder in sehr engem Kontakt mit ihnen, sind dann noch sehr zart und klein, oder es sind nur mehr gestreifte Einschlüsse in den Zellen zu sehen und der x-Körper ist verschwunden. Im Gegensatz zu den x-Körpern sind meistens mehrere striated bodies in einer Zelle vorhanden. Schon bei der Bildung der Einschlüsse bemerkt man, daß aus verschiedenen Stellen des x-Körpers die gestreiften Körper hervorragen, die auch bereits doppelbrechend sind.

In den Kronblättern der Blüte dieser Nelkenpflanze kommen die üblichen hexagonalen, prismatischen Einschlüsse vor.

Unter anderem hat Goldstein (1926) striated bodies, zwar in fixiertem Material deutlicher, aber auch in lebenden Zellen von mosaikkranken *Nicotiana tabacum* festgestellt und beschrieben. Wehrmeyer (1939) hingegen stellt die gestreiften Massen von Goldstein (1926) und anderen Autoren als Fixationsartefakte essigsäurehaltiger Fixiermittel hin. Cook (1947, 142) äußert sich über das striated material: „Some workers have believed them to be due to acids in the fixing fluids, while others have reported finding them in living cells.“ Bei den eigenen Untersuchungen an *Dianthus caryophyllus* wurden die gestreiften Körper in der Zelle ohne vorherige Fixierung in vivo beobachtet, sie sind daher nicht als Artefakte anzusehen.

Die zweite Gruppe der Einschlusskörper von *Dianthus caryophyllus* ist, wie schon oben erwähnt, neben den x-Körpern durch tetraedrische Kristalle charakterisiert. In den Epidermiszellen sehr junger Blätter treten x-Körper auf. In ausgewachsenen Blättern finden sich in der Epidermis



Abb. 8. *Dianthus caryophyllus*. Mehrere gestreifte Körper in einer Blattepidermiszelle.

und im darunterliegenden Chlorenchym Kristalle von tetraedrischer Gestalt. Diese stellen eine ungewöhnliche Form von Viruseinschlusskörpern dar. Daß es sich dabei aber tatsächlich um solche handelt, konnten durchgeführte Überimpfungsversuche zeigen. Sehr selten liegt nur ein Kristall in einer Zelle, meistens sind sie zu mehreren zusammengesetzt (Abb. 9). Sie sind auf Grund der mikrochemischen Reaktionen als Eiweißkristalle anzusprechen und gleichen in ihrem Verhalten ganz den hexagonalen Kristallen von Gruppe I.

In den Kronblättern konnte im Bereich des Nagels die Umwandlung der x-Körper in kristallartiges Material beobachtet werden; es ragten aus manchen x-Körpern bereits fertige, aber sehr kleine tetraedrische Kristalle heraus. Der x-Körper wandelt sich hier nicht, wie es größtenteils der Fall ist, in seiner ganzen Masse in kristallines Material um, sondern bleibt teilweise noch erhalten (Abb. 10). Außer diesen, mit den x-Körpern in engstem Zusammenhang stehenden, tetraedrischen Kristallen im Nagel der Kronblätter kommen bei jungen Blüten in der oberen und unteren Epidermis ausschließlich x-Körper vor. Dagegen enthalten ältere, nahe am Verwelken stehende Blüten auch in der Platte der Kronblätter die Tetraeder.

Bei der Anwendung der gebräuchlichen Eiweißreaktionen (Millon, Biuret, Xanthoprotein) geben die x-Körper aus der Blatt- und Blütenepidermis positive Reaktionen. Außer Eiweiß enthalten die x-Körper der Blattepidermiszellen Öltröpfchen; mit Sudan III färben sich die Lipoidtröpfchen rot



Abb. 9. *Dianthus caryophyllus*. Tetraedrische Kristalle in Ein- oder Mehrzahl in Blattepidermiszellen.

und im Fluoreszenzmikroskop leuchten sie nach Einwirkung von Coriphosphin ($\text{pH} = 5,1$) in leuchtend gelbgrüner Farbe (Reiter 1957).

Wie schon erwähnt, sind die x-Körper aus der Blütenepidermis sehr feinkörnig; ihnen fehlen, wie aus Färbe- und Fluorodromierungsversuchen hervorgeht, die Lipoidgrana; sie scheinen nur aus Eiweiß zu bestehen.

Bald hat 1949 eine Färbemethode für Viruskörper in erkrankten Pflanzengewebe entwickelt. Von Rawlins (1957, 307) wurde sie etwas abgewandelt, er meint: „Bald's stain when applied to pure virus or to cell

inclusions associated with virus infections is apparently the most specific biological stain for plant viruses ...“ Rawlins (1957) konnte an den „crystall-like“-Zelleinschlüssen und vakuolisierten x-bodies aus TMV-infizierten Pflanzenzellen mit der modifizierten Bald's stain eine Rotfärbung erzielen; auch der Nukleolus färbte sich rot. Trotzdem empfiehlt Rawlins die Baldische Färbung mit ähnlichen Vorbehalten anzuwenden wie andere Virusfärbungen.

Thomas und Mitarbeiter (1951) geben an, daß sich bei der Auffindung des Carnation Mosaic Virus verschiedene Virusfärbungen, unter anderen Bald's stain nicht bewährten. Die x-Körper aus der Blatt- und Blütenepidermis von *Dianthus caryophyllus* färbten sich mit der modifizierten Bald's stain tiefrot; die gleiche Farbe wies auch der Nukleolus auf. Daher kann man annehmen, daß Ribonucleinsäure, die schon in sehr vielen pflanzlichen Viren nachgewiesen wurde, auch in den x-Körpern von *Dianthus caryophyllus* enthalten ist.

Infolge der Unbeständigkeit der hexagonalen prismatischen Kristalle war es schwierig, positive Eiweißreaktionen zu erzielen. Am besten erwies sich die nach Baker (1956) modifizierte Millon'sche Reaktion; sie beruht gleichfalls auf der Anwesenheit von Tyrosin. Als Fixierungsmittel für diese Kristalle stellten sich Alkohol oder Formalin am geeignetsten heraus. Bald's stain, mit der man bei den x-bodies so gute Ergebnisse erzielt, kann ebenfalls nicht angewendet werden, da die Kristalle schon bei der Fixierung verschwinden.

Die tetraedrischen Kristalle der Gruppe II dagegen geben sehr leicht die Eiweißreaktionen, aber in ihrem sonstigen Verhalten, z. B. gegenüber der Bald's stain, sind sie genau so labil wie die hexagonalen Kristalle. Beide Kristallformen färben sich mit Säurefuchsin (Zimmermann 1893) kräftig rot, mit Safranin intensiv orange. Die x-Körper aus dieser Gruppe unterscheiden sich auch chemisch und färberisch in keiner Weise von den x-Körpern der Gruppe I.

Hölzl und Bancher (1959) untersuchten im UV-Licht Eiweißkristalle aus der Kartoffelknolle und stellten dabei fest, daß die Eiweißkristalle nur in toten Zellen oder isoliert eine Primärfluoreszenz zeigen. Sie bezeichnen sie als „Fremd-Primär-Fluoreszenz“, da sie wahrscheinlich durch Adsorption des austretenden Zellsaftes hervorgerufen wird. Eine ähnliche Primärfluoreszenz tritt auch bei den hexagonalen und tetraedrischen Eiweißkristallen von *Dianthus caryophyllus* auf. In den lebenden Epidermiszellen des Blattes

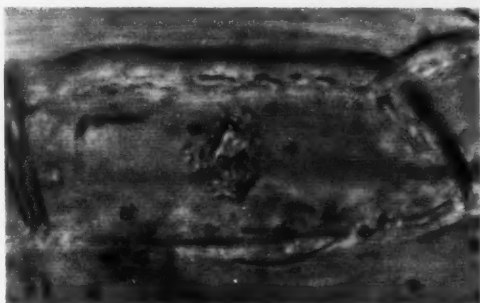


Abb. 10. *Dianthus caryophyllus*. X-Körper mit tetraedrischem Kristall in einer Epidermiszelle des Nagels.

und der Blüte geben nur die Vakuolen im UV-Licht eine mattblaue Primärfluoreszenz. In verletzten und abgestorbenen Zellen treten dagegen die Kristalle in deutlicher blaugrauer Fluoreszenz hervor.

3. Übertragungsversuche

In der gärtnerischen Praxis werden die Nelkenvirosen durch Stecklinge verbreitet. Als Insektvektor gilt die Blattlaus *Myzus persicae*, obwohl dies bei einigen Virose, wie z. B. Carnation Mottle Virus und Carnation Streak Virus noch umstritten ist. Die meisten Nelkenviren sind durch Pfropfung (Creager 1943) und durch einfache Überimpfung des Preßsaftes von kranken Pflanzen auf gesunde künstlich übertragbar. Thomas und Baker (1952) geben außerdem bei Nelkenmosaikvirus eine natürliche Übertragung durch die Wurzeln an. Die Nelkenviren lassen sich auf gesunde Nelkenarten, vorwiegend *Dianthus caryophyllus* und *Dianthus barbatus* durch eine der vorhin erwähnten Arten übertragen. Daneben werden als Testpflanzen *Gomphrena globosa* (Wright 1951), *Chenopodium album* (Gasiorkiewicz 1956) und *Chenopodium amaranticolor* häufig verwendet. Weitere Testpflanzen für Nelkenviren geben Brierley und Smith (1957) in ihrer Zusammenfassung über die Nelkenviren der Vereinigten Staaten an. Aus ihren Untersuchungen geht hervor, daß bei Nelken Virusübertragung durch Samen nicht erfolgt.

Ich versuchte nun das Virus von Nelkenpflanzen, die Zelleinschlüsse besitzen, durch Einreiben des Preßsaftes der Blätter auf zwei Monate alte Sämlinge von *Dianthus caryophyllus*, *Dianthus barbatus* und *Chenopodium album* zu übertragen. Der Preßsaft wurde von Blättern gewonnen, die äußerlich keine Flecken oder sonstigen Krankheitssymptome zeigten; in ihren Zellen befanden sich aber die oben besprochenen Einschlüsse von Gruppe I und II.

Ungefähr 8 bis 12 Tage nach der Inokulation mit dem Preßsaft von Pflanzen mit Einschlüssen der Gruppe I entstanden an den Blättern von *Dianthus caryophyllus* zuerst äußerliche Krankheitssymptome in Form einer Mosaikfleckigkeit. Die Flecken traten sehr deutlich an ganz jungen Blättern hervor. Je älter die Blätter werden, desto weniger Flecken sind an ihnen zu erkennen und in der weiteren Entwicklung erscheinen die Blätter normal, ohne äußere Symptome. Nach Brierley und Smith (1947) verschwinden an älteren mosaikkranken *Dianthus*blättern die an jungen Blättern vorhandenen gesprenkelten Muster. Dies ist nicht nur bei Carnation Mosaic Virus, sondern auch von anderen Nelkenviren (Brierley und Smith 1957) bekannt.

Nach Verlauf weiterer 2 bis 3 Tage waren in den Blattepidermiszellen die ersten protoplasmatischen Zellveränderungen sichtbar. Zunächst traten x-Körper nur in Epidermiszellen, die sich oberhalb von Blattnerven befinden, auf. In weiterer Folge waren sie aber, wenn auch nur fleckenweise, in der ganzen Blattepidermis und im subepidermalen Chlorenchym anzutreffen (Abb. 11). Auch bei infizierten Nelkensämlingen waren in den Blättern nur x-Körper und keine hexagonalen Kristalle vorhanden. Das Virus

der ersten Gruppe ruft an den Blättern von *Chenopodium album* nach 6 bis 8 Tagen rundliche helle Flecken hervor. Die Flecken sind über die ganze Blattspreite verteilt und ähneln sehr den „local lesions“ von *Chenopodium amaranticolor*, die durch Carnation Mottle Virus hervorgerufen werden (Brierley und Smith 1957). Die charakteristischen Einschlüßkörper treten aber bei dem infizierten *Chenopodium album* nicht auf.

Nur äußere Symptome in Form von hellen Flecken zeigen auch infizierte *Dianthus barbatus*-Sämlinge nach 8 bis 12 Tagen. Überimpfungsversuche mit dem Preßsaft von Blättern mit Einschlüssen der Gruppe II an *Dianthus caryophyllus* führten schon nach 6 bis 8 Tagen sowohl zu äußeren als auch inneren mikroskopisch erkennbaren Krankheitssymptomen. Die Fleckung der Blätter ist stärker ausgeprägt als bei der ersten Gruppe. Allerdings wiesen ungefähr 40% der infizierten Nelkensämlinge äußerlich überhaupt keine Veränderung auf. Wohl aber besaßen sie die gleichen Zelleinschlüsse wie diejenigen mit Flecken an den Blättern. Gleichzeitig mit den Blattflecken werden auch Einschlüßkörper in den Zellen sichtbar, und zwar neben den tetraedrischen



Abb. 11. *Dianthus caryophyllus*. Vakuolisierter x-Körper in Blattepidermiszelle.

Kristallen auch x-Körper. Sie sind nur einige Tage nach ihrem Erscheinen noch sichtbar, später sind nur mehr tetraedrische Kristalle in den Zellen vorhanden. Es ist anzunehmen, daß sich die x-Körper vollständig und sehr rasch in Kristalle umwandeln, denn es wurden nie Zwischenformen beobachtet. An den Blättern von *Chenopodium album* und an *Dianthus barbatus* entstanden nach einer Inkubationszeit von 6 bis 8 Tagen bzw. von 8 bis 12 Tagen dieselben Flecken wie in Gruppe I.

Ähnliche Infektionsversuche an *Nicotiana glutinosa* blieben erfolglos.

Eine allgemeine Entwicklungsstörung der infizierten Sämlinge konnte im Vergleich zu gesunden nicht beobachtet werden. Eine hellere grüne Farbe kranker Pflanzen wird, wie schon Forsberg (1958) an viruskranken *Dianthus* feststellte, durch helle Flecken an den Blättern verursacht. Eine Ertragsminderung an virusinfizierten Nelken kann nur in großangelegten Versuchen, wie sie Creager (1944) ausgeführt hat, festgestellt werden.

Während wiederholter Untersuchungen — vom März 1959 bis Juni 1960 — gelang es nicht, von dem im Handel erhältlichen *Dianthus caryophyllus* zelleinschlußfreie, i.e. virusfreie Pflanzen zu finden. Brierley und Smith (1947) kamen durch Anwendung des „sweet william“-Testes an käuflichen Nelken zum gleichen Ergebnis und sie erklären es damit, daß es 5 bis 10 Jahre dauert, bis eine neu aufgetretene Nelkenvarietät in den Handel gelangt. Bei der leichten Übertragung der Nelkenviren gibt es in dieser

langen Zwischenzeit genug Möglichkeiten, daß die Mehrzahl aller Nelkenpflanzen infiziert wird.

In bezug auf die Nomenklatur der Nelken-Virosen besteht noch keine einheitliche Auffassung. Um welchen Nelkenvirusstamm es sich bei den beiden oben beschriebenen handelt, kann noch nicht endgültig festgestellt werden. Thomas (1954) hat durch Überimpfungsversuche an *Dianthus barbatus* bei Nelkenmosaikvirus allein acht Stämme festgestellt. Carnation Streak Virus scheidet von vornherein aus, da es nur durch Pfropfung übertragen wird (Thomas 1949). Da unser Nelkenvirus auf *Chenopodium album* erst nach 6 bis 8 Tagen Flecken hervorruft, diese bei dem Carnation Ringspot Virus aber schon nach 4 bis 5 Tagen (Brierley und Smith 1957) auftreten sollen, dürfte es sich bei dem hier beschriebenen Fall entweder um das Carnation Mosaic oder das Carnation Mottle Virus handeln.

Zusammenfassung

Die äußeren Symptome der verschiedenen Virosen von *Dianthus caryophyllus* sind oft gering, ja sie können sogar ganz fehlen. Für die Diagnose gewinnt daher die Feststellung innerer Symptome, nämlich des Vorkommens von Zelleinschlußkörpern besonderes Interesse. In allen daraufhin untersuchten Gartennelken ließen sich stets sowohl amorphe x-Körper als auch kristalline Einschlüsse auffinden. Die Kristalle waren von besonderer Mannigfaltigkeit, besonders gut ausgebildet waren hexagonale prismatische und tetraedrische; die letzteren stellen eine sonst ungewöhnliche Form von Viruseinschlußkörpern dar. Daß es sich wirklich um Viruseiweißkristalle handelt, wurde durch den positiven Ausfall von Übertragungsversuchen erwiesen.

Literatur

- Baker, J. R., 1956: The histochemical recognition of phenols, especially tyrosine. Quart. J. micr. Sci. 97.
- Bald, J. G., 1949: A method for the selective staining of viruses in infected plant tissues. Phytopathology 39.
- Bawden, F. C., 1956: Plant viruses and virus diseases, 3. Aufl., Waltham, Mass.
- Brandes, J., 1956: Über das Aussehen und die Verteilung des Tabakmosaikvirus im Blattgewebe. Phytopath. Z. 26.
- Brierley, P., und F. F. Smith, 1947: Carnation and *Gladiolus* virus diseases pose serious problems. Florists' Review 99.
- 1957: Carnation viruses in the United States. Phytopathology 47.
- Cook, M. T., 1947: Viruses and virus diseases of plants. Minneapolis.
- Creager, D. B., 1943: Carnation mosaic. Phytopathology 33.
- 1944: Mosaic in carnations reduces the quality and the yield of flowers. Florists' Review.
- Forsberg, J. L., 1958: Carnation diseases. Illinois State Florists' Association Bull. 188.
- Gasiorkiewicz, E. C., 1956: *Chenopodium album*, local lesion indicator plant for carnation mosaic virus. Phytopathology 46.

- Goldstein, B., 1926: A cytological study of the leaves and growing points of healthy and mosaic diseased tobacco plants. *Bull. Torrey Bot. Club* 53.
- Hölzl, J., und E. Bancher, 1959: Fluoreszenzmikroskopische Studien an der Kartoffelknolle. *Protoplasma* 50.
- Iwanowski, D., 1905: Über die Mosaikkrankheit der Tabakpflanze. *Z. Pflanzenkrankh.* 13.
- Kassanis, B., 1955: Some properties of four viruses isolated from carnation plants. *Ann. appl. Biol.* 43.
- Klinkowski, M., 1958: *Pflanzliche Virologie*. 2. Berlin.
- Köhler, E., und M. Klinkowski, 1954: Viruskrankheiten. In: Sorauer, *Handb. Pflanzenkrankh.* 2., 6. Aufl. Berlin-Hamburg.
- Noordam, D., T. H. Thung, und P. H. van der Want, 1951: Investigations on carnation mosaic. *I. Tijdschr. PlZiekt.* 57.
- Rawlins, T. E., 1957: A modification of Bald's stain for viruses and for cell inclusions associated with virus infections. *Phytopathology* 47.
- Reiter, L., 1957: Vitale Fluorochromierung pflanzlicher Viruseinschlußkörper. *Protoplasma* 48.
- Schmelzer, K., 1958: Virusnachweis. In: Klinkowski, *Pflanzliche Virologie*. 1. Berlin.
- Sheffield, F. M., 1939: Some effects of plant virus diseases on the cells of their hosts. *J. microsc. Soc.* 59.
- Smith, K. M., 1957: A textbook of plant virus diseases. London.
- Steele, R. L., and R. C. Williams, 1953: Identification of crystalline inclusion bodies extracted intact from plant cells infected with tobacco mosaic virus. *Amer. J. Bot.* 40.
- Thomas, W. D., 1949: Hosts of carnation viruses other than carnation. *Carnation Craft*.
- R. R. Baker, and J. G. Zoril, 1951: The use of ultraviolet light as a means of diagnosing carnation mosaic. *Science* 113.
- and R. R. Baker, 1952: Root transmission of carnation mosaic virus. *Phytopathology* 42.
- 1954: Pathogenicity of eight strains of carnation mosaic virus. *Colorado Flowers Growers' Assoc.* 51.
- Wehrmeyer, W., 1959: Entwicklungsgeschichte, Morphologie und Struktur von Tabakmosaikvirus-Einschlußkörpern unter besonderer Berücksichtigung der fibrillären Formen. *Protoplasma* 51.
- Wright, C. M., 1951: *Gomphrena globosa*, a local-lesion indicator plant for the carnation mosaic virus. *Phytopathology* 41.
- Zimmermann, A., 1895: Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle. 1. Tübingen.

Die Feinstruktur der Plastiden von *Tradescantia albiflora* (Kth.) bei Eisenmangelchlorose¹

II. Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Von

Ingrun Lamprecht

Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster/Westfalen

Mit 26 Textabbildungen

(Eingegangen am 8. April 1960)

Einführung

Im Teil I dieser Veröffentlichung wurde über lichtmikroskopische Untersuchungen an den Plastiden ausgewachsener chlorotischer Blätter von *Tradescantia albiflora* (Kth.) berichtet (Lamprecht 1961 a). Es konnte gezeigt werden, daß anstelle erwachsener grüner Chloroplasten bei Eisenmangel — dem Vergilbungstyp der untersuchten Blätter und Blattzonen entsprechend — zunehmend chlorotische Plastiden von immer geringerem Differenzierungsgrad ausgebildet werden. In vollkommen farblosen Blättern liegen schließlich kleine amöboide, chlorophyllfreie Plastiden vor, die homogen sind oder ein bis wenige Grana aufweisen. Erst nach lange anhaltender Mangelkultur kommt es zu lichtmikroskopisch nachweisbaren Degenerationserscheinungen der Plastiden.

Diese Befunde sprechen dafür, daß die Ausdifferenzierung der jugendlichen Plastiden durch Eisenmangel gehemmt, unterbrochen oder vollkommen verhindert wird. Welcher Differenzierungsgrad der chlorotischen Plastiden im erwachsenen Blatt letztlich erreicht wird, hängt davon ab, wie weit sich die Plastiden bis zum Einsetzen der Eisenmangelwirkung in den entsprechenden Geweben entwickeln konnten.

Die Frage, ob die chlorotischen Plastiden noch als vital anzusprechen sind oder ob sie bereits Anzeichen einer beginnenden Degeneration auf-

¹ Vorgetragen auf der Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft in Klagenfurt, Mai 1959.

weisen, ist mit Hilfe der Lichtmikroskopie allein nicht zu klären. Die Feinstrukturen der Plastiden, wie z. B. die Sekundärgrana der Chloroplasten oder auch die Grana chlorotischer Plastiden, liegen in ihren Dimensionen an der Grenze lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens. Da das erhöhte Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskops Vergrößerungen gestattet, die diejenigen des Lichtmikroskops um 1–2 Zehnerpotenzen übertreffen, war zu erwarten, daß sich aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Feinstrukturen ein näherer Aufschluß über die Natur der chlorotischen Plastiden ergeben würde.

Methodik

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden am Elmiskop I der Fa. Siemens, Berlin, im Physikalischen Institut der Universität Münster, Direktor Prof. Dr. E. Kappler, hergestellt².

Für diese Aufnahmen wurde das Material in folgender Weise vorbereitet:

Etwa 0,8–1 mm breite und 4–5 mm lange Blattstreifen wurden mit 1% OsO_4 (gepuffert mit Veronalazetat, pH = 7.0) infiltriert und im Dunkeln bei Zimmertemperatur 2 Std. fixiert. Zunächst wurde in fließendem Leitungswasser gewässert (1 Std.), dann in mehrfach erneuertem destillierten Wasser (1 Std.). Bei Kontrastierung mit 1% Uranylazetat (Strugger 1956 b) folgte auf die Fixation eine einstündige Wässerung, Übertragung in Uranylazetat (1 Std.) und erneute Wässerung (1 Std.). Zum Entwässern wurden die Streifen für je $\frac{1}{2}$ Std. in 30%, 50%, 70%, 80%, 96% Alkohol und dreimal in absoluten Alkohol eingelegt. Anschließend kamen die Objekte in ein Methacrylatgemisch (Verhältnis der Volumina von Methacrylsäure-Butylester zu -Methylester = 8:2; Katalysator: Dichlorbenzoylperoxyd, 90:1 in Gewichtsprozenten), das nach $\frac{1}{2}$ Std. gewechselt und dann über Nacht stehengelassen wurde. Nach erneutem Wechsel am anderen Morgen wurden die Blattstreifen in Gelatinekapselfn eingebettet, die mit Methacrylatgemisch gefüllt waren. Die Polymerisation erfolgte im Laufe von 24 Std. im Thermostaten bei 47°C.

Ultradünnschnitte wurden am Ultramikrotom LKB 3314 nach Sjöstrand mit Stahlmessern und am Ultramikrotom nach Fernandez-Morán von Leitz, Wetzlar, mit Diamant- und Glasmessern hergestellt und auf Kupfernetzen mit Formvarfolien aufgefangen. — Es wurden vornehmlich Querschnitte der Blattstreifen angefertigt. Für Blattflächenschnitte wurden die Blöckchen von vornherein so angespitzt, daß je nach Lage der Blattstreifen das Palisaden- oder das Schwammparenchym freilag. Eine Bestimmung der Lage der Blattstreifen ist wegen der sehr viel größeren Zellen der oberen Epidermis leicht möglich.

Aufnahmedaten der elektronenmikroskopischen Aufnahmen: Strahlspannung 60 kV (nur in wenigen Fällen 80 kV); Primärvergrößerungen: 8000, 8800, 15.000, 21.500. Die Nachvergrößerung auf das Zwei- bis Dreifache erfolgte am Varioscop (Agfa) mit dem 10,5-cm-Objektiv.

Für Untersuchungen plasmatischer Strukturen im Elektronenmikroskop ist ein optimaler Erhaltungszustand unerlässlich (über die Bedeutung der dazu erforderlichen methodischen Voraussetzungen vgl. Strugger 1957 a). Als sehr gutes Fixationsmittel hat sich 1%ige, mit Veronalazetat auf pH 7 gepufferte OsO_4 erwiesen. Ein Nachteil der Osmiumsäure ist ihr sehr langsames Eindringen in das Gewebe, das eine ungleichmäßige Fixation zur Folge hat; diese Schwierigkeit wird

² Für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen bin ich Herrn Dr. L. Reimer und Fräulein R. Horig zu Dank verpflichtet.

im allgemeinen durch die Verwendung sehr klein dimensionierter Gewebestückchen umgangen.

Das großzellige, wegen seiner weiträumigen Interzellularen sehr locker gebaute Mesophyll von *Tradescantia* kommt den Forderungen nach einer sehr raschen und gleichmäßigen Fixation außerordentlich entgegen. Werden die schmalen Blattstreifen des zu untersuchenden Gewebes (Größe 4×1 mm) direkt mit der 1%igen OsO_4 infiltriert, so sind innerhalb weniger Sekunden alle Mesophyllzellen von der Fixierungsflüssigkeit umspült; durch die zarten Zellmembranen dringt die Osmiumsäure in alle Zellen gleichmäßig ein. An dem kontinuierlichen Dunklerwerden der Blattstreifen läßt sich die fortschreitende Fixation leicht verfolgen.

Der gute Erhaltungszustand der fixierten Objekte zeigt sich insbesondere am Cytoplasma, das den Zellwänden fast immer lückenlos anliegt (vgl. Abb. 13). Im Falle starker Abhebungen des Plasmawandbelages von der Zellmembran sind auch die Plastiden und die übrigen Zellbestandteile dermaßen geschädigt, daß sich diese Schäden — unter Berücksichtigung der in Vitalbeobachtungen gewonnenen Erfahrungen — ohne weiteres auf die Einwirkung des Eisenmangels zurückführen lassen (vgl. Abb. 21), zumal immer in der gleichen Weise fixiert und eingebettet wurde (s. S. 165).

Parallel zur Fixation wurden die Objekte, soweit möglich, an Handschnitten lichtmikroskopisch *intra vitam* kontrolliert. Es wurde zumeist äußerlich einheitlich chlorotisches Gewebe fixiert; es können jedoch gemäß dem beschriebenen Chlorosegradienten der Blätter auch in kurzen Blattlängsstreifen schon unterschiedliche Plastidenformen vorliegen. Es ist daher insbesondere bei Verwendung von Gewebestreifen aus den Übergangszonen diffus blasser werdender Blatteile (Typen IV—VII) außerordentlich schwierig, den elektronenmikroskopisch feststellbaren Differenzierungsgrad der Plastiden zu lichtmikroskopisch beobachteten Plastidenstrukturen eindeutig in Beziehung zu setzen, zumal während der Präparation die charakteristische Färbung der Blattstreifen verlorengeht (Schwärzung durch OsO_2 , Extraktion der Pigmentreste in der Alkoholreihe). Wegen der genannten Schwierigkeiten werden die elektronenmikroskopischen Befunde unabhängig von den geschilderten makroskopisch sichtbaren Chlorosegradienten beschrieben.

Die Plastiden erwachsener grüner Blätter von Kontrollpflanzen

Die lichtmikroskopisch erschlossene und auf Grund polarisationsoptischer Methoden geforderte Feinstruktur somatischer Plastiden ist mit Hilfe der Ultradünnschnitttechnik prinzipiell auch für den sublichtmikroskopischen Bereich bestätigt und darüber hinaus weiter erforscht worden.

Erwachsene Chloroplasten wurden von Cohen and Bowler (1953) an *Nicotiana*, von Leyon (1954) und von Steinmann and Sjöstrand (1955) an *Aspidistra*, von Hodge, McLean and Mercer (1955) an *Zea Mays*, von Strugger (1956 a) an *Chlorophytum comosum*, von v. Wettstein (1957 a) an *Hordeum distichum* und von Buvat (1958) an *Elodea canadensis* an Hand von Ultradünnschnitten untersucht. Ein Schema der Chloroplastenentwicklung unter Berücksichtigung der bis dahin erschienenen Literatur gibt Perner (1956 b).

Der ausdifferenzierte Chloroplast stellt ein System aus parallelen Lamellenlagen dar, in welche die Sekundärgrana durch lokale Lamellenvermehrung in der Lamellenebene eingelagert sind. Bei den untersuchten Objekten

lassen sich zwei Typen der Granaanordnung unterscheiden. Die Sekundärgrana von *Zea* und *Hordeum* sind in Form begrenzter Lamellenpakete aus-

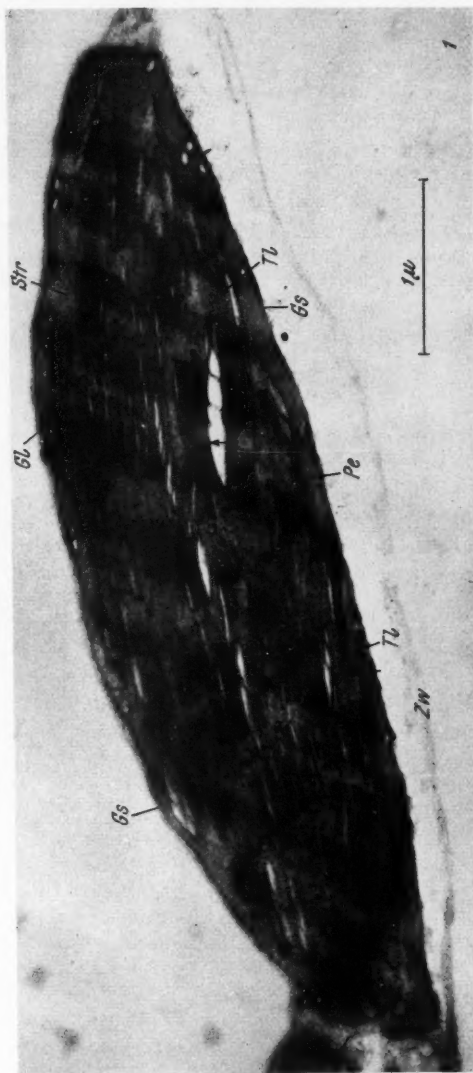


Abb. 1. Längsschnitt durch einen erwachsenen Chloroplasten aus Kontrollpflanzen von *Tradescantia albiflora* mit durchgehenden Granastapeln. *Zw* Zellwand; *Gls* Chloroplastengrenzschicht; *Pe* Peristromium; *Str* Stroma; *TL* Trägerlamellen; *Gl* Granalamellen; die Pfeile weisen auf besonders deutliche Lamellenpartien hin. Näheres im Text. Primärvergrößerung 8000 : 1; Nachvergrößerung 28.500 : 1.

gebildet und können von einer Lamellenlage zur anderen gegeneinander verschoben sein oder auch senkrecht übereinanderliegen. Der zweite Typ ist in den Chloroplasten von *Aspidistra* und *Chlorophytum*, annähernd auch

bei *Elodea*, verwirklicht; hier lassen sich im Längsschnitt einzelne Grana nicht mehr erkennen, da dicht lamellierte Granasäulen senkrecht zur Streichrichtung der Lamellen den Chloroplasten in seiner gesamten Dicke durchziehen. Nach Menke (1957) entstehen solche Granasäulen durch eine während der Präparation eintretende Entquellung der interlamellaren Stromaschichten, die die Lamellen der Grana dichter als in vivo zusammendrängt. Der Unterschied zwischen beiden Typen besteht in ihrem verschiedenen Lamellierungsgrad; er kann auf den physiologischen Zustand der erwachsenen Chloroplasten zurückgeführt werden (v. Wettstein 1957 b). Das Stroma stellt nach Frey-Wyssling und Mühlethaler (1949) ein korpuskulär-disperses System dar, in dem globuläre Strukturelemente von 200–300 Å Durchmesser die disperse Phase bilden. Es ist zwischen die einzelnen Lamellen eingelagert. Eine periphere, nicht lamellar strukturierte Zone des Stromaplasmas konnte Strugger (1956 a) an den Chloroplasten von *Chlorophytum* nachweisen und mit dem schon 1908 von Senn geforderten Peristromium identifizieren. Eine entsprechende Zone („granular layer“) ist in den Aufnahmen von Leyon (1954) an *Aspidistra* zu finden. Die lange umstrittene Plastidengrenzschicht (vgl. Küster 1956, S. 405) wurde schon von Leyon (1954) an Ultradünnschnitten beobachtet und ist nach Strugger (1956 a) zweischichtig und aus reihenartig angeordneten, makromolekularen Bausteinelementen zusammengesetzt.

Die erwachsenen, voll ausdifferenzierten Chloroplasten von *Tradescantia albiflora* entsprechen dem *Aspidistra*- bzw. dem *Chlorophytum*-Typ. Ihre Sekundärgrana nehmen als typische Geldrollensäulen (Strugger 1956 a) senkrecht zur Lamellierungsrichtung nahezu die ganze Dicke des Chloroplasten ein. Abb. 1 zeigt einen fast median getroffenen Chloroplasten im Plasmawandbelag (Plastidendurchmesser 5,9 μ ; Dicke 1,6 μ), der von einem sehr dünnen Plasmamantel umgeben ist. Die Chloroplastengrenzschicht ist gut erhalten und als doppelschichtige Membran ausgebildet. Sie ist durchschnittlich 100–150 Å dick; die gemessenen Werte schwanken zwischen 50 und 200 Å (vgl. Strugger 1956 a: 120–140 Å).

Der zentrale Lamellenkörper durchzieht das Plastid in einem Komplex von Trägerlamellen und Granastapeln. An seiner Peripherie bleibt eine schmale Zone von unregelmäßiger Dicke (0,05–0,17 μ) lamellenfrei. Sie ist von Stromaplasma erfüllt und entspricht dem von Strugger (1956 a) beschriebenen Peristromium im Sinne Senns (1908). An einigen Stellen scheinen die Lamellen in diese Zone hinein auszuscheren. Innerhalb des zentralen Lamellenkörpers ist das Stroma nur an einzelnen Stellen als deutliche Schicht zwischen den Lamellenlagen vorhanden.

Die Geldrollen der Granastapel sind nur wenig verschoben und auf Grund der dichteren Packung der Lamellen und ihrer stark elektronenstreuenden Grenzpunkte (vgl. Strugger 1956 a, Buvač 1958) von den Trägerlamellen gut zu unterscheiden. Mit Durchmessern von 0,5 μ bis maximal 0,7 μ liegen diese Granasäulen noch im Bereich lichtmikroskopischer Sichtbarkeit; in der Flächenansicht des Chloroplasten heben sie sich im lebenden Präparat auf Grund ihrer größeren Dichte und der erhöhten Konzentration an Chlorophyll und Carotinoiden von den Trägerlamellen ab.

Sie stellen die lichtmikroskopisch beobachteten Sekundärgrana erwachsener Chloroplasten dar (vgl. Lam p r e c h t 1961 a, Abb. 5 und 6).

Die Doppellamellenstruktur läßt sich für die locker liegenden, mäßig stark elektronenstreuenden Trägerlamellen an vielen Stellen nachweisen. Jede Lamelle besitzt stärker elektronenstreuende Randschichten, die eine etwa halb so breite helle Innenschicht einschließen. Die durchschnittliche Dicke der Trägerlamellen liegt zwischen 50 und 100 Å. Dagegen sind die Lamellen der Granastapel so dicht gelagert, daß an Hand dieser Aufnahme (Abb. 1) keine sicheren Aussagen über ihre Struktur gemacht werden können. Auch ist es schwierig, das Verhältnis der Träger- und Granalamellen genau auszuzählen. Die dunklen Grenzpunkte der Granalamellen sind auffallend variabel in ihrer Größe. Eine Übereinstimmung mit der Anzahl der angrenzenden Trägerlamellen wurde nicht festgestellt (vgl. auch Bu v a t 1958). An den Granalamellen schräg angeschnittener Granasäulen konnte stellenweise eine dem Bau der Trägerlamellen entsprechende Doppelschichtigkeit festgestellt werden.

Nach welchem in der Literatur beschriebenen Modus (v. Wettstein 1957 b) Grana- und Trägerlamellen bei *Tradescantia* miteinander verknüpft sind, ist aus den vorhandenen Aufnahmen nicht ersichtlich.

Osmiophile Granula wurden in Kontrollen nur vereinzelt beobachtet. Sie besitzen einen Durchmesser von 600–1000 Å. Der abgebildete Chloroplast ist stärkefrei. Die Zweige, deren Blättern das untersuchte Gewebe entstammte, wurden vor der Fixation 2 Tage in Dunkelkultur gehalten; der Stärkenachweis in dem ursprünglich sehr stärkereichen Blattmesophyll war nach dieser Zeit negativ.

Die Struktur der Plastiden bei zunehmender Eisenmangelwirkung

Bei der Sichtung des elektronenmikroskopischen Aufnahmемaterials ergeben sich sieben charakteristische Stufen zunehmender Chlorosewirkung. Die Schwierigkeiten, diese im sublichtmikroskopischen Bereich unterschiedenen Plastidenstadien mit den lichtmikroskopisch beobachteten Stadien chlorotischer Plastiden in direkte Beziehung zu setzen, wurden bereits angedeutet (S. 164). Die mit A bis G bezeichneten Stadien werden daher zunächst an Hand von Aufnahmen beschrieben.

1. Plastidenstadien ohne deutlich erkennbare Degenerationserscheinungen

Plastidenstadium A

Die Plastiden dieses Stadiums stammen aus der Übergangszone zwischen grünem und chlorotischem Gewebe eines an der Basis aufgehellten Blattes vom Typ IV–V. Den lichtmikroskopischen Befunden entsprechend finden sich auch in Ultradünnschnitten große Chloroplasten mit zahlreichen Sekundärgrana. Diese liegen bei einem mittleren Durchmesser von $0,43 \mu$ (höchster gemessener Wert $0,69 \mu$) im Bereich lichtmikroskopischer Sichtbarkeit (vgl. Lam p r e c h t 1961 a, Abb. 11). An diesen Plastiden macht sich jedoch

bereits eine erste Störung der Ordnung der Chloroplastenstruktur bemerkbar (Abb. 2). Beim Vergleich mit Kontrollen fällt zunächst eine Verschiebung des Verhältnisses von Stromaanteil zu Lamellen zugunsten des Stromas auf. Im Längsschnitt ist der zentrale Lamellenkörper in einzelne Lamellenlagen aufgegliedert, in denen Granabezirke und Trägerlamellen wechseln. Die Zwischenräume sind von Stromaschichten unterschiedlicher Dicke erfüllt.

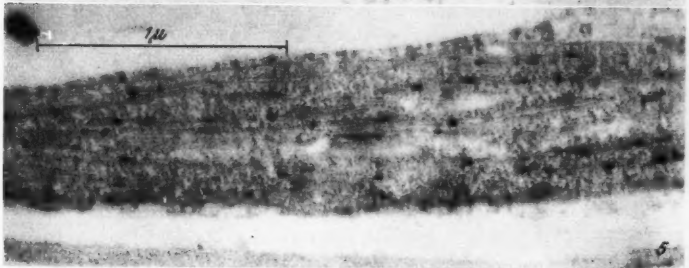
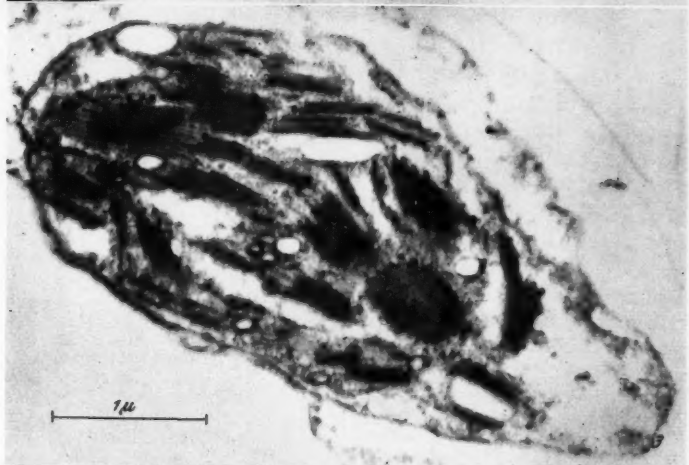
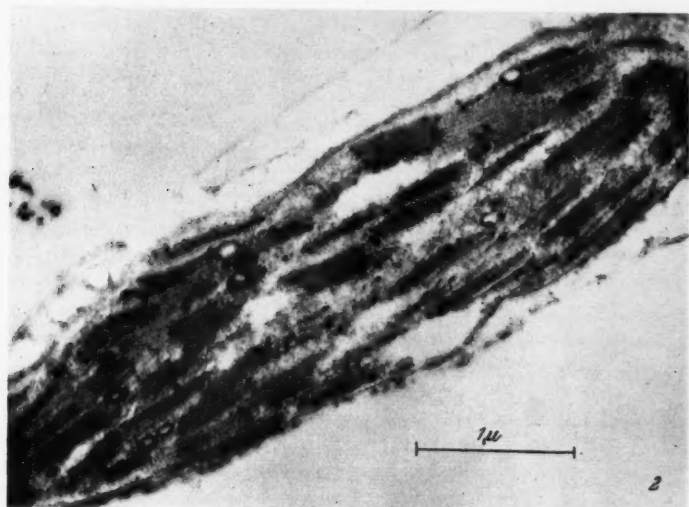
Der Durchmesser der Lamellenlagen ist meist kürzer als der des ganzen zentralen Lamellenkörpers. Die Sekundärgrana, erkennbar an ihrer hohen Elektronenstreuung, bilden keine durchgehenden Geldrollen, sondern sind bei begrenzter Höhe in einzelne Lamellenpakete getrennt und nur selten senkrecht übereinandergelagert. Damit erinnern diese Plastidenstadien an die voll ausdifferenzierten Chloroplasten von Mais und Gerste, wie sie von Hodge et al. (1955) und v. Wettstein (1957 a) abgebildet worden sind. Für Mais und Gerste konnte nachgewiesen werden, daß die Chloroplasten beim Altern eine deutliche Tendenz zeigen, ihre Grana zusammenzulagern und die Lagenstruktur aufzugeben. Die Unterschiede zwischen *Zea* und *Hordeum einerseits*, *Chlorophytum* und *Aspidistra* andererseits sind danach auf den physiologischen Zustand der erwachsenen Chloroplasten zurückzuführen (v. Wettstein 1957 b). Die beiden letztgenannten Gattungen besitzen also eine noch weitergehende Differenzierung ihrer Lamellenstruktur. Aus dieser Perspektive gesehen, ist eine erste Hemmung der Plastidenentwicklung als Folge des einsetzenden Eisenmangels schon für die Plastiden des Stadiums A durchaus denkbar.

Noch deutlicher wird die Störung des normalen Differenzierungsganges an Abb. 3. Die Lagenstruktur ist nicht deutlich zu erkennen, doch lassen sich einzelne Sekundärgrana und ganze Trägerlamellenbüschel unterscheiden. Die Grana, nur zum Teil paarweise durch Trägerlamellen miteinander verbunden, sind in Längs-, Flächen- und Schrägschnitten getroffen. Im linken Teil der Aufnahme ist die Streichrichtung der Lamellen zweier Grana sogar um fast 90° gegeneinander verschoben. In dieser Vielfalt der Lamellenebenen kommt eine erste Störung besonders gut zum Ausdruck. Die Stabilität der Lamellenstruktur ist vermindert, und infolge der gleichzeitigen Vermehrung des Stromaanteils ist die Beweglichkeit der Plastidenmasse erhöht. Bei dem abgebildeten Chloroplasten ist eine leichte Drehung um die Chloroplastenlängsachse möglicherweise die Ursache dafür, daß

Abb. 2. Plastidenstadium A — Längsschnitt durch ein schwach chlorotisches Plastid mit isolierten Sekundärgrana und Trägerlamellen in deutlicher Lagenstruktur. Primärvergrößerung 15.000 : 1; Nachvergrößerung 25.000 : 1.

Abb. 3. Plastidenstadium A — Schwach chlorotisches Plastid mit isolierten Sekundärgrana, die im linken Teil der Aufnahme im Längsschnitt, im rechten Teil in Flächenansicht getroffen sind; links sehr deutliche Trägerlamellen. Primärvergrößerung 15.000 : 1; Nachvergrößerung 25.000 : 1.

Abb. 5. Plastidenstadium B — Ausschnitt aus einem Plastidenlängsschnitt mit Lamellenlagen aus je 2—5 Doppellamellen von dreischichtigem Feinbau. Primärvergrößerung 15.000 : 1; Nachvergrößerung 40.000 : 1.



ideale Längsschnitte durch Sekundärgrana vor allem im linken Teil der Aufnahme zu finden sind, reine Flächenschnitte jedoch im rechten, dazwischen alle möglichen Schrägschnitte.

Unabhängig von der Schnittrichtung sind alle Grana von den schon an Kontrollen beschriebenen, stark elektronenstreuenden Grenzpunkten umgeben. Sie treten nur an der Grenze zwischen den Grana- und den Trägerlamellen, niemals aber zwischen der Lamellenfläche und dem Stroma auf (vgl. dazu aber die Abb. von Granaschrägschnitten bei Buvač 1958!). Die Trägerlamellen sind dicker als in Kontrollen und als Doppellamellen ausgebildet. Ihre Dicke liegt zwischen 120 und 180 Å (Streubreite aller Meßwerte: 90–270 Å). Die Lamellen der Sekundärgrana sind so dicht gelagert, daß sie optisch kaum zu trennen sind. Daher wirken die Grana fast völlig kompakt. An günstigen Stellen können Lamellendicken von 30–50 Å gemessen werden (Streubreite aller Meßwerte: 20–80 Å).

Das Stroma bietet bei geringerer Elektronenstreuung trotz seiner etwas locker-ungleichmäßigen Verteilung und Dichte einen insgesamt grauen Aspekt. Da ein zentraler Lamellenkörper nicht wie bei Kontrollen vorhanden ist, kann auch ein Peristromium im Sinne Struggers (1956 a) nicht deutlich unterschieden werden. Im Stroma finden sich entweder vereinzelte Stärkekörner oder Spalten, die auf abgebaute Stärke deuten, außerdem die in der Literatur schon häufig beschriebenen osmiophilen Granula („osmiophile granules“, Leyon 1954, „Globuli“, Frey-Wyssling 1955 und v. Wettstein 1957 a). Diese werden im Zusammenhang mit dem Plastidenstadium F besprochen, wo sie in Gruppen auftreten.

Plastidenstadium B

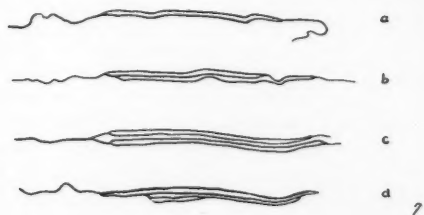
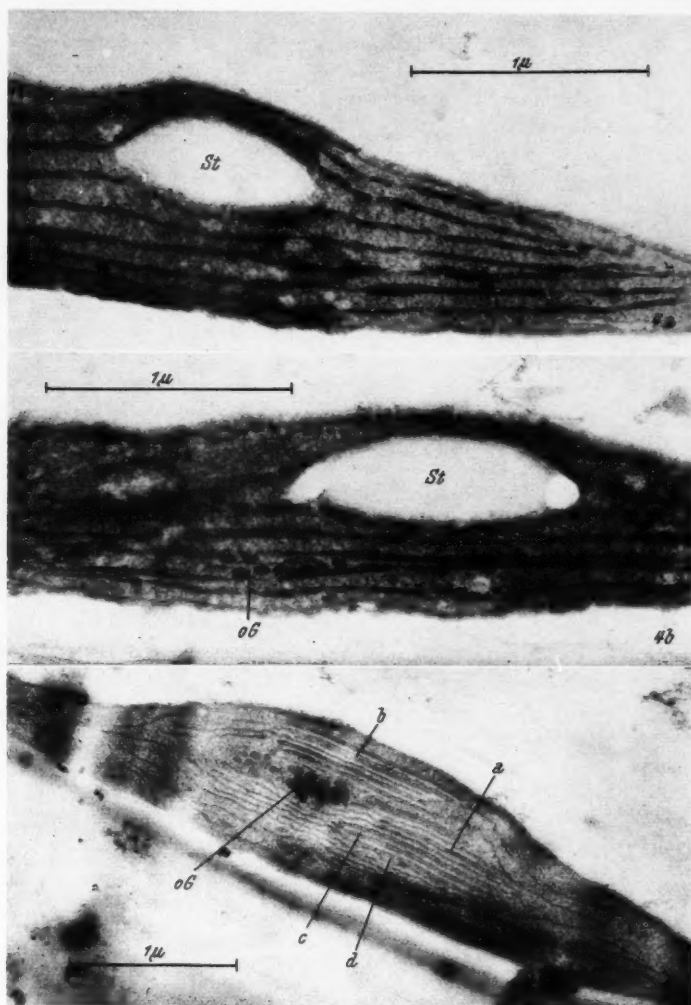
Für die Plastiden des Stadiums B sind eine weitere Zunahme des Verhältnisses Stroma/Lamellen zugunsten des Stromas und lange, das ganze Plastid durchziehende Lamellenlagen ohne Ausbildung von Sekundärgrana charakteristisch. Diese Plastiden stammen aus dem Mesophyll der Basis schwach chlorotischer Blätter vom Typ VI–VII und wurden nach 48 Tagen Kulturdauer fixiert.

Besonders auffallend ist ihre regelmäßige Schichtung. Lamellenlagen und Stromaschichten wechseln miteinander ab (Abb. 4). Die Lamellenlagen, fast

Abb. 4 a und b. Plastidenstadium B — Vermehrung des Stromaanteils bei zunehmender Eisenmangelchlorose; lange Lamellenlagen mit ersten Ansätzen der Sekundärgranabildung; Stärkekörner (St) zwischen den Lamellenlagen; im Stroma der Abb. 4 b eine Gruppe osmiophiler Granula (oG). Primärvergrößerung 15.000 : 1; Nachvergrößerung: Abb. 4 a 38.500 : 1; Abb. 4 b 40.000 : 1.

Abb. 6. Plastidenstadium B — Plastid mit ersten Anfängen der Granabildung: Lange parallel gelagerte Lamellen sind durch mehrfache Aufspaltung im Zentrum ihrer Fläche vermehrt; zwischen den Lamellenlagen eine Gruppe osmiophiler Granula (oG). Primärvergrößerung 8000 : 1; Nachvergrößerung 26.500 : 1.

Abb. 7. Lamellenpartien aus dem Plastid der Abb. 6. Aufspaltung einer Lamelle in 2 (a), 5 (b) und 4 (c, d) Lamellen.



immer dem Plastidendurchmesser entsprechend, setzen sich aus mindestens 1–2, oft sogar aus 2–4 Doppellamellen zusammen. Die Anzahl und die Dicke der Lamellen lassen sich nur bei den genau senkrecht zur Lamellenebene geführten Schnitten erkennen. Je nach der Zahl der Doppellamellen sind die Lamellenlagen 120–280 Å dick (Streubreite 40–380 Å). Sekundärgrana fehlen in diesen Plastiden; jedoch treten innerhalb der Lamellenlagen lokal begrenzte Verdickungen auf, die sich auf eine Vermehrung der Anzahl der Doppellamellen (auf 5–6 gegenüber 2–4 Lamellen) zurückführen lassen. Diese Verdickungen sind im Schnitt stromlinienförmig und 250–550 Å dick (Streubreite 200–800 Å) und liegen z. T. von Schicht zu Schicht senkrecht übereinander. Ihr mittlerer Durchmesser beträgt 0,2–0,4 μ (Streubreite 0,1–0,6 μ). Obwohl diese Dimensionen schon in den Bereich lichtmikroskopischer Auflösbarkeit fallen, sind die Verdickungen zu gering, als daß sie sich im Lichtmikroskop bemerkbar machen könnten; in der Flächenansicht erscheinen die Plastiden daher homogen. Die Verdickungen werden als erster Ansatz zur Bildung von Sekundärgrana und Geldrollenstruktur gedeutet. Der auf dieser Stufe der Plastidendifferenzierung in den entsprechenden Zellen einsetzende Eisenmangel bewirkt offenbar eine Einstellung der weiteren Entwicklung zu erwachsenen Chloroplasten.

Über die Feinstruktur des Stromas können an Hand der vorliegenden Aufnahmen keine sicheren Aussagen gemacht werden. Kleine Gruppen osmiophiler Granula von 500–800 Å Durchmesser und linsenförmige Stärkekörnchen sind zwischen den auseinanderweichenden Lamellen in das Stroma eingebettet. Diese Plastiden, die aus einem schwach chlorotischen, noch chlorophyllhaltigen Blattgewebe stammen, haben sicherlich Assimilationsvermögen besessen. Das Auftreten von Chlorophyll ist zwar an Lamellen, jedoch nicht unbedingt an das Vorhandensein von Grana gebunden; das beweisen die ebenfalls aus einfachen Lamellenlagen aufgebauten, granafreien Chromatophoren der Algen (vgl. die Untersuchungen an *Fucus*, Leyon und v. Wettstein 1954, und an *Chlamydomonas*, Sager and Palade 1957; weitere Literatur bei Granick 1955 und v. Wettstein 1957 b), denen die chlorotischen Plastiden des Stadiums B vergleichbar sind. Die Auffassung, daß diese chlorotischen Plastiden infolge des einsetzenden Eisenmangels auf einem den Algenchromatophoren ähnlichen Zwischenstadium ihrer Entwicklung stehengeblieben sind, findet in neueren Untersuchungen an *Cabomba* eine Unterstützung: während des normal ablaufenden Differenzierungsvorganges treten im Postmeristem Plastiden gleichen Feinbaues auf (Lamprecht und Müller-Spieckermann³); vgl. auch Menke (1959). Auch die Chloroplasten der Parenchymseidenzellen von *Zea Mays* sind in gleicher Weise organisiert (Hodge, McLean and Mercer 1955).

Der Feinbau der Doppellamellen läßt sich an einem etwas stärker chlorotisch gehemmten Plastid analysieren (Abb. 5). In diesem Plastid, das im Lichtmikroskop ebenfalls ein homogenes Aussehen besitzt, sind die recht kontrastarmen Lamellenlagen nur aus 2–3 Doppellamellen gebildet, die

³ In Vorbereitung.

sich schwach von der Grundmasse des Stromas abheben. Die Doppellamellen sind aus drei Feinschichten zusammengesetzt: stärker elektronenstreuende Randschichten von gleichmäßiger Dicke (30–50 Å; Streubreite 10–70 Å) schließen eine sehr helle, etwas variabelere, meist dickere Innenschicht ein (60–120 Å; Streubreite 30–190 Å). Die Dicke der Doppellamellen mißt 100–160 Å (Streubreite 70–260 Å). Diese Dreischichtigkeit des Lamellenfeinbaues kann bei *Tradescantia* sowohl in Kontrollen als auch in allen lamellenführenden Chlorosestadien beobachtet werden.

Eine Vorstellung von den ersten Anfängen der Granabildung und der Ausbildung der Lagenstruktur aus einzelnen Lamellen vermitteln Abb. 6 und 7. Das Material stammt aus dem Mesophyll der gelbgrünen Basis von Blättern des Typs VIII und wurde nach 10 Wochen Kulturdauer fixiert; der Zweig war erst spät ausgetrieben.

Das der Zellwand anliegende Plastid ist nahezu median geschnitten. Seine Peripherie ist weitgehend lamellenfrei, während in seinem Innern zahlreiche Lamellen sehr dicht parallel gelagert sind. Bei lichtmikroskopischer Untersuchung wird ein solches Lamellenpaket in der Flächenansicht das Bild eines einzigen großen Granums bieten, wie es auch in den Plastiden der Abb. 15, 16 und 17 (Lamprecht 1961 a) beobachtet wurde. Das Lichtbrechungsvermögen dieses Granums wird gegenüber demjenigen des Stromas erhöht sein, so daß es auch ohne Färbung dunkel erscheint (vgl. Lamprecht 1961 a, S. 128 und 132). Im Zentrum des Lamellenpakets hat eine starke Vermehrung der Doppellamellen stattgefunden. An vielen Stellen läßt sich die Aufspaltung einzelner, oft besonders dicker Doppellamellen in zwei individualisierte parallele Lamellen gut erkennen (Abb. 7 a). Meist liegen 2 oder 3 Doppellamellen nebeneinander und vereinigen sich an den Rändern wieder zu einer Lamelle (Abb. 7 b und c). Die Aufspaltung scheint im Zentrum der Lamellenfläche zu beginnen. Rechts unten im Plastid liegt ein Komplex von drei Doppellamellen, deren unterste von rechts nach links an Dicke zunimmt und im linken Teil in zwei deutlich getrennte Lamellen aufgespalten ist (Abb. 7 d). Zwischen den Lamellenlagen ist eine Gruppe osmiophiler Granula angeschnitten. Zur Peripherie hin streichen die Lamellen als isolierte Doppellamellen in die Stromasubstanz aus. Sie sind oft gewellt, an den Lamellenrändern umbogen oder eingeschlagen und nicht so geordnet gelagert wie im Zentrum.

Die isoliert liegenden Doppellamellen sind 80–120 Å dick (Streubreite 40–240 Å; Substanzvermehrung vor der Spaltung!). Bei der Vermessung der Lamellenlagen in Abhängigkeit von der Anzahl der in ihnen enthaltenen Doppellamellen ergeben sich folgende Werte:

- 2 Lamellen pro Lage: 200–260 Å (Streubreite 180–500 Å)
- 3 Lamellen pro Lage: 400–600 Å (Streubreite 300–740 Å)
- 4 Lamellen pro Lage: 600–700 Å —

Die an Hand der Abb. 6 und 7 beschriebene Spaltung der Lamellenflächen unterstützt die von Strügger entwickelten Vorstellungen der identischen Reduplikation der Lamellen als Folge einer identischen flächenhaften Reproduktion ihrer makromolekularen Strukturmuster (Strügger 1956 a). Wird der funktionstüchtige Chloroplast als selbständiger Genträger aufge-

faßt, so stellt er nach Strugger (1951) ein Duplikantensystem mit lamellarem Ordnungsprinzip dar, in dem die Lamellen und ihre Bausteine die letzten elektronenmikroskopisch nachweisbaren Duplikanteneinheiten sind.

Plastidenstadium C

Eine strenge Trennung der einzelnen Plastidenstadien ist verständlicherweise nicht möglich. So stellen die folgenden Plastiden einen Übergang zu Stadien stärkerer Chlorosewirkung dar. Sie stammen aus der Basis vollkommen chlorotischer Blätter (X). Die Kultur war zum Zeitpunkt der Blattentnahme und Fixation 66 Tage alt.

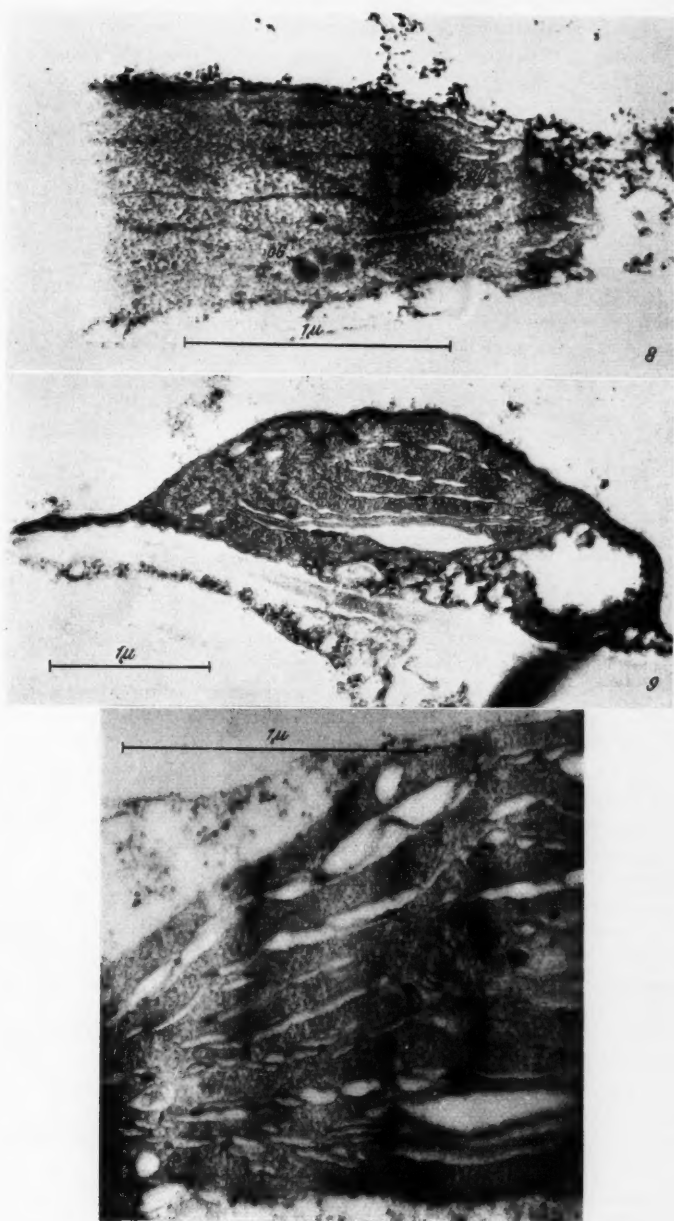
Die Plastiden des Stadiums C können durch weitere Zunahme des Verhältnisses Stroma/Lamellen zugunsten des Stromas, durch einzelne lange Lamellen und starke Amöboidie gekennzeichnet werden. Im Lichtmikroskop erscheinen auch diese Plastiden homogen.

Schmale, dichte Doppellamellen des schon bekannten dreischichtigen Feinbaues durchziehen mit unregelmäßigem Verlauf das Stroma (Abb. 8). Ihre Hauptstreichrichtung verläuft parallel zur Plastidenfläche. Auch die Lamellen der Abb. 9 sind aus drei Feinschichten aufgebaut. Die Randschichten besitzen konstante Dicke und hohe Elektronenstreuung; die Innenschichten dagegen scheinen optisch leer zu sein und lassen auf Grund ihrer ungleichmäßigen Dicke auf starke Deformationsvorgänge schließen (Randschichten 35–70 Å; Innenschicht 70–1650 Å). Eine entsprechende, zunehmende Deformation kennzeichnet die Lamellen des folgenden Stadiums D und wird dort ausführlicher besprochen (S. 178). Das Stroma läßt sich in diesen Aufnahmen recht gut erkennen. In eine helle Grundsubstanz scheinen fädige Strukturelemente eingebettet zu sein, die — ähnlich wie die von Strugger (1956 c, 1957 c, d) im Cytoplasma aufgefundenen Cytonemata — schraubig aufgerollt sind (vgl. auch Strugger 1957 b und Strugger und Kriger 1960). Für eine eingehendere Analyse des Stromas reicht die Schärfe des vorhandenen Aufnahmematerials nicht aus. Der Kontrast der dispersen Phase des Stromas (s. S. 166) ist in diesen Aufnahmen stärker als

Abb. 8. Plastidenstadium C — Längsschnitt durch ein Plastid mit einzelnen langen Lamellen. Weitere Vermehrung des Stromaanteils bei stärkerer Eisenmangelwirkung; im Stroma osmiophile Granula (oG); Kontrastierung mit UO_2 . Primärvergrößerung 8000 : 1; Nachvergrößerung 43.000 : 1.

Abb. 9. Plastidenstadium C — Längsschnitt durch ein amöboides Plastid mit einzelnen langen Lamellen von dreischichtigem Feinbau; Innenschicht der Lamellen teilweise stark deformiert; rechts ein eingerollter Stromafortsatz, in den eine lange Lamelle hineinzieht; Kontrastierung mit UO_2 . Primärvergrößerung 800 : 1; Nachvergrößerung 26.000 : 1.

Abb. 10. Plastidenstadium D — Ausschnitt aus einem Plastidenlängsschnitt. Stromaanteil stark vermehrt; lamellare Komponente in Form kurzer Lamellenstücke von dreischichtigem Feinbau vorhanden, deren Innenschicht teilweise deformiert ist, so daß es zur Aufspaltung der Lamellen kommt. Primärvergrößerung 21.500 : 1; Nachvergrößerung 49.000 : 1.



normalerweise: das Material wurde nach der OsO_4 -Fixation zusätzlich mit Uranylazetat behandelt (vgl. S. 163). Demzufolge haben die protein- und proteidhaltigen Strukturen der Zelle nach Strugger (1956 b und c) eine starke Erhöhung ihrer Elektronenstreuung durch elektroadsorptive Bindung der Uranyl-Kationen erfahren. Die Lamellen der Plastiden heben sich daher nicht mehr so stark vom umgebenden Stroma ab. Aus diesem Grunde wurde in den übrigen Fällen bei der Präparation auf eine zusätzliche Kontrastierung mit Uranylazetat verzichtet, da sich die im Zuge der Chlorose auftretenden Veränderungen des Plastidenfeinbaues vornehmlich in der Lamellenstruktur der Plastiden äußern.

Die Amöboidie der Plastiden wird in der Ausbildung langer Stromafortsätze deutlich. Im rechten Teil der Abb. 9 ist ein solcher eingerollter Stromafortsatz getroffen, der sehr schmal und fast 2μ lang ist. Eine lange, schon vorher zur oberen Plastidengrenzschicht parallel verlaufende, unverquollene Lamelle zieht bis fast ins Ende des Stromafortsatzes hinein. Zu beiden Seiten sind die Räume zwischen den Grenzschichten mit Stroma-plasma erfüllt. Ähnliche Stromafortsätze konnten in vielen Aufnahmen beobachtet werden.

Plastidenstadium D

Mit dem Plastidenstadium D ist, elektronenmikroskopisch gesehen, der Höhepunkt der Eisenmangelchlorose erreicht: bei stärkster Hemmung der Ausdifferenzierung ihrer Feinstrukturen sind diese offensichtlich lebens- und ergrünungsfähigen Plastiden weitgehend frei von Degenerationerscheinungen. Sie stammen aus einem noch vollkommen chlorotischen Gewebe aus der Mitte von Blättern, die nach 55 Tagen Kulturdauer begonnen hatten, von der Basis her zu ergrünen, ohne daß der Nährlösung Eisen zugefügt worden war (vgl. Lamprecht 1961 a, S. 125). Mit dieser Ergrünung erwiesen sich die Plastiden der vorher vollkommen chlorotischen Zellen als voll differenzierungsfähig (loc. cit. S. 136). Um ihre Feinstruktur und den zu diesem Zeitpunkt erreichten Grad der Entwicklungshemmung zu untersuchen, wurden die knapp oberhalb der kritischen Ergrünungszone liegenden Blattgewebe für die Fixierung verwendet.

In den Plastiden des Stadiums D ist das Verhältnis Stroma/Lamellen maximal zugunsten des Stromas verschoben. Für die hohe Amöboidie sind Struktur und Mengenverhältnis der beiden Komponenten des Plastidenaufbaues maßgeblich: das Stroma, in seinem Anteil stark vermehrt, bietet den gleichen Aspekt wie in den Plastiden des Stadiums C (Abb. 10, 13, keine zusätzliche Kontrastierung); die lamellare Komponente ist auf sehr kurze Lamellenstücke reduziert, die sich aber ohne weiteres aus der durch Abb. 6 (B) —8 (C)—9 (C) gebildeten Reihe zunehmender Chlorose ableiten lassen.

Bei lichtmikroskopischer Untersuchung sind die Plastiden des Stadiums D homogen.

Im Stroma treten osmiophile Granula, einzelne Längsspalten (Abb. 11) und, in der Nähe der Plastidengrenzschicht (Abb. 11), scharf begrenzte Vakuolen auf; außerdem ist in diesen Plastiden fast immer Stärke vorhanden, bei der es sich um Reservestärke handeln dürfte. Die Stärkekörner, die an

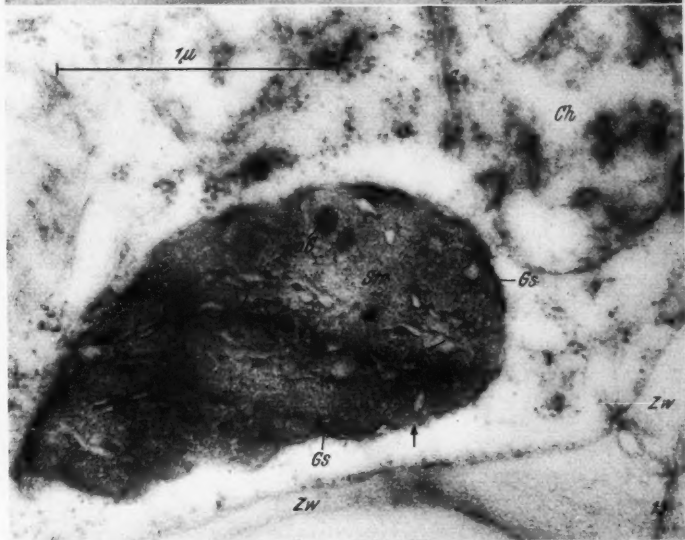
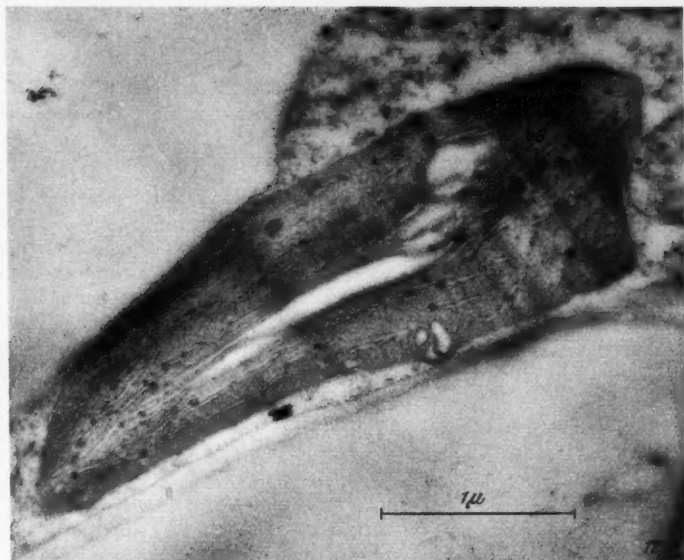


Abb. 11. Plastidenstadium D — Längsschnitt durch ein Plastid wie in Abb. 10. Lagenmäßige Anordnung der Lamellenstücke; im Stroma einzelne osmiophile Granula (*oG*). Primärvergrößerung 8000 : 1; Nachvergrößerung 31.500 : 1.

Abb. 13. Plastidenstadium D — chlorotisches Plastid mit kurzen Lamellenstücken (*Ls*) sowie osmiophilen Granula (*oG*) im reichlich vermehrten Stroma (*Str*); doppelte Plastidengrenzschicht (*Gs*) mit einer Einstülpung (Pfeil) ins Stroma. Im Plasmawandbelag Chondriosomen (*Ch*) und ein Golgiapparat (*G*); *Zw* Zellwand. Primärvergrößerung 21.500 : 1; Nachvergrößerung 45.500 : 1.

ihrer geringen optischen Dichte leicht zu erkennen sind, liegen zwischen den aus Lamellenstücken gebildeten Schichten im Stroma (Abb. 12); da sie während der Präparation geringfügig entquollen sind, haben sich die angrenzenden Lamellen und Lamellenstücke von der restlichen Plastidensubstanz abgehoben. Die einzelnen Lamellenstücke sind bei unterschiedlicher Länge im allgemeinen in deutlich wahrnehmbaren Lagen parallel zur Plastidenfläche angeordnet (Abb. 10 und 11). Im Aufbau sind sie wiederum aus drei Feinschichten zusammengesetzt, von denen die Randschichten konstante Dicke besitzen, die Innenschichten aber auffallend variabel sind (Abb. 10 bis 13). Ihre Deformation kann u. U. sehr stark sein und zu einer Aufspaltung der Lamellenstücke führen (Abb. 10); das kommt in den Meßwerten der drei Feinschichten und im folgenden Diagramm (Fig. 1) zum Ausdruck:

Plastidenstadium D: Dicke der Lamellenstücke (vgl. S. 173).

Gesamtdicke:	130—250 Å	(Streubreite 100—860 Å)
Innenschicht:	90—210 Å	(Streubreite 20—680 Å)
Randschichten:	30— 50 Å	(Streubreite 10—130 Å)

In diesen Werten sind nur die als geschlossene Lamellen vorliegenden Strukturen berücksichtigt, nicht aber die wahrscheinlich aus ihnen entstandenen Spalten.

Fig. 1 a gibt die Dicke der Lamellen und ihrer Feinschichten im Plastidenstadium B wieder. Die Hauptverteilung der erhaltenen Meßwerte in A wird durch den dicken Querbalken, die gesamte Streuung der Werte durch den dünnen Balken markiert; die Zahl über den Balken bezeichnet die Anzahl der Messungen. In Abhängigkeit von der Verteilung der Meßwerte ist die Dicke der Randschichten und der Innenschicht sowie die Dicke der Gesamtlamelle — die Summe aus beiden Randschichten und der Innenschicht — angegeben. Bei stärkerer Chlorose ist die Schwankung der Werte für die Innenschicht, und damit auch für die Dicke der Gesamtlamelle, wesentlich größer; dies trifft für das Plastidenstadium D zu, dessen Lamellenfeinbau in Fig. 1 b dargestellt ist. Die hohe Streubreite der Meßwerte für Gesamtdicke und Innenschicht weist auf eine unterschiedliche Deformation der letzteren hin.

Der hier beschriebene Lamellenfeinbau scheint prinzipiell auch für die Grana- und Trägerlamellen erwachsener Chloroplasten von *Tradescantia* gültig zu sein (vgl. S. 167) und ist in den chlorotischen Plastiden nur infolge der Deformation der Innenschicht deutlicher ausgeprägt. Damit unterscheiden sich die Plastiden von *Tradescantia* grundlegend von Maischloroplasten, deren Lamellenfeinbau von Hodge et al. (1955) sehr gründlich untersucht worden ist. Nach den Aufnahmen dieser Autoren liegt im Zentrum jeder Lamelle eine stark elektronenstreuende Schicht, die Proteincharakter haben soll (P-zones). Zwei Schichten von gerichteten Lipoiden mit geringer Elektronenstreuung (L-zones) schließen zu beiden Seiten an und sind gegen das Stroma durch etwas stärker elektronenstreuende Schichten (C-zones, hydrophile Endgruppen des Chlorophylls und der Kohlenwasserstoffketten der Lipide) abgegrenzt. Die starke Elektronenstreuung der

Proteinlage soll auf die Reaktionsfähigkeit der schwefelhaltigen Eiweißstoffe der Chloroplasten mit OsO_4 (Bahr 1954) zurückzuführen sein.

Dem von Hodge, McLean and Mercer (1955) gegebenen Schema stehen die Befunde an *Aspidistra* und *Chlorophytum* gegenüber. Nach den Abbildungen von Leyon (1954, Abb. 12) und dem von Steinmann and Sjöstrand (1955) entworfenen Schema sind die Lamellen von *Aspidistra* aus stark elektronenstreuenden Randschichten von 65 Å (Grana-) bzw. 30 Å (Trägerlamellen) Dicke und einer ebenfalls 65 Å dicken hellen Innenschicht

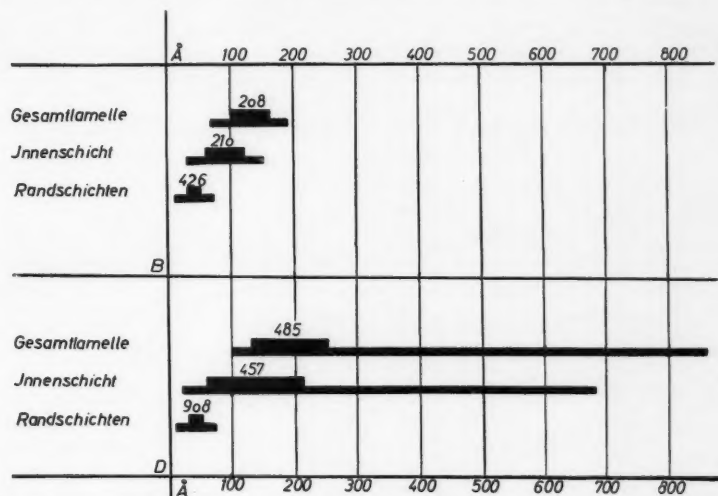


Fig. 1 a und b. Die Dicke der Lamellen und Lamellenfeinschichten bei zunehmender Chlorose in den Plastidenstadien B und D. Näheres im Text.

aufgebaut. Strugger kommt zu der Überzeugung, daß die scheinbare Doppelschichtigkeit der Chloroplastenlamellen von *Chlorophytum* zumindest in den Grana auf eine ausgeprägtere Osmiophilie der makromolekularen Bausteine ihrer peripheren Zonen zurückzuführen ist (1956 a, Abb. 1 bis 3).

Tradescantia scheint im Aufbau ihrer Chloroplasten nicht nur in bezug auf die Granastruktur, sondern auch auf den Lamellenfeinbau dem *Aspidistra*-Typ zu entsprechen (vgl. S. 167).

2. Plastidenstadien mit deutlich erkennbaren Degenerationserscheinungen

Degenerationserscheinungen an chlorotischen Plastiden können bereits lichtmikroskopisch als Folge lange anhaltenden Eisenmangels festgestellt werden (Lamprecht 1961 a, Abb. 19 und 20). Allerdings müssen die Entmischungs- und Vakuolisationserscheinungen schon recht grob sein, damit sie auch lichtmikroskopisch deutlich sichtbar werden; mit derart ge-

schädigten Plastiden ist der Chloroseendzustand in Form eines vollkommenen Zusammenbruchs der Plastidenstrukturen erreicht (Abb. 18–21).

Mit Hilfe des Elektronenmikroskops läßt sich jedoch nicht nur eine beginnende Degeneration leichter feststellen, sondern es ist außerdem möglich, aus den noch vorhandenen Strukturen den zu Beginn der Degeneration erreichten Entwicklungszustand der Plastiden abzulesen.

Plastidenstadium E

Eine derartige, lichtmikroskopisch noch nicht sichtbare, beginnende Degeneration läßt sich an Plastiden des Stadiums E zeigen (Abb. 14).

Die Plastiden stammen aus der Basis voll chlorotischer Blätter (Typ X). Die Kulturdauer betrug zum Zeitpunkt der Blattentnahme und Fixation 105 Tage.

Diese Plastiden besitzen keine lichtmikroskopisch sichtbare Struktur und müssen daher im Lichtmikroskop homogen aussehen. An ihrer klaren Begrenzung durch eine doppelschichtige Plastidengrenzschicht und an ihrer Dichte und Elektronenstreuung lassen sie sich eindeutig als Plastiden identifizieren. Die Lamellenstrukturen aber sind hier nur vereinzelt zu finden; am oberen Bildrande der Abb. 14 sind letzte Reste von Lamellenstücken des beschriebenen dreischichtigen Feinbaues angeschnitten. Für die Dicken der Feinschichten wurden folgende Werte gemessen:

Gesamtdicke:	140–240 Å	(Streubreite 140–290 Å)
Innenschicht:	60–180 Å	(Streubreite 60–220 Å)
Randschichten:	10–50 Å	(Streubreite 10–90 Å)

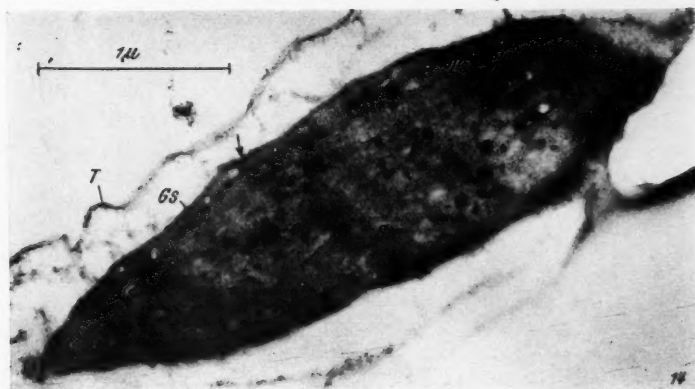
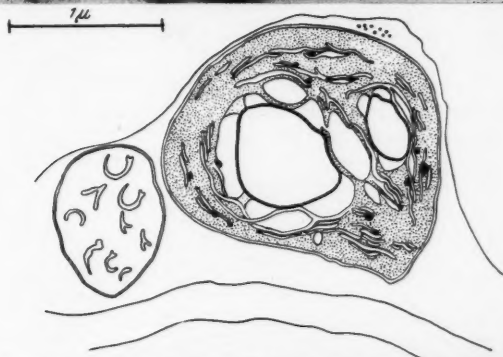
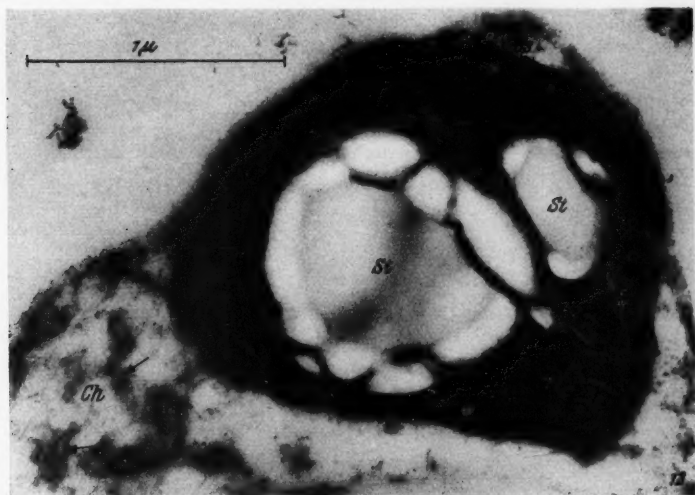
Die Doppelschichtigkeit der Plastidengrenzschicht läßt sich am oberen Schnitttrand des Plastids (Abb. 14, bei „Gs“ und Pfeil) gut nachweisen. Im linken oberen Drittel zeigt die Grenzschicht eine Einstülpung ins Stroma (neben „Gs“).

Abgesehen von den wenigen Lamellenresten bestehen die Plastiden des Stadiums E fast nur noch aus Stromamaterial. Es ist sehr dicht und unregelmäßig strukturiert. Im Stroma befinden sich zahlreiche osmiophile Granula, die durch ihre hohe Elektronenstreuung und ihre scharf umrissenen, runden Konturen auffallen; sie liegen einzeln oder in Gruppen zusammen.

Abb. 12. Plastidenstadium D — Chlorotisches Plastid mit kurzen Lamellenstücken (*Ls*) von dreischichtigem Feinbau und mit zwei Stärkekörnern (*St*) sowie wenigen osmiophilen Granula (*oG*) im reichlich vorhandenen Stroma (*Str*); *Gs* Plastidengrenzschicht. Links ein Chondriosom (*Ch*); die Pfeile markieren 2 Tubuli. Primärvergrößerung 21.500 : 1; Nachvergrößerung 41.500 : 1.

Abb. 12 a. Vereinfachte Zeichnung nach Abb. 12. Vergrößerung 25.000 : 1.

Abb. 14. Plastidenstadium E — Längsschnitt durch ein Plastid mit ersten Degenerationserscheinungen, ableitbar aus dem Plastidenstadium D. Reste kurzer Lamellenstücke (*Ls*) sowie zahlreiche osmiophile Granula (*oG*) im Stroma (*Str*); doppelte Plastidengrenzschicht (*Gs*), beim Pfeil besonders deutlich zu erkennen; neben „Gs“ eine Einstülpung der Grenzschicht ins Stroma; *T* Tonoplast. Primärvergrößerung 15.000 : 1; Nachvergrößerung 31.000 : 1.



Außerdem treten andere, meist sehr viel kleinere und niemals scharf konturierte, aber ebenfalls stark elektronenstreuende Partikeln auf; vielleicht stellen sie Artefakte abgebauter Lamellenreste dar, da ähnliche Teilchen an den Rändern der Lamellenstücke des Plastidenstadiums D vorkommen (Abb. 11 und 13). Das Gesamtbild dieser Plastiden läßt vermuten, daß sie infolge Degeneration unmittelbar aus den Plastiden des Stadiums D hervorgehen. Dafür spricht auch das vereinzelte Vorkommen von Stärke im Stroma dieser Plastiden, bei der es sich wahrscheinlich um nicht abgebaute Reservestärke handelt.

Die kurzen Lamellenstücke des Stadiums D stellen offenbar sehr empfindliche und labile Strukturen dar; eine beginnende Degeneration der Plastiden scheint zunächst zum Abbau dieser Lamellenstücke zu führen (Stadium E), ohne das Stroma schon sichtbar zu schädigen. Demgegenüber scheinen einmal ausgebildete lange Lamellen (Stadien B und C) stabiler zu sein; das zeigt sich an den Plastiden des Stadiums F, die auf Grund von Entmischungserscheinungen aus den Stadium B und C ableitbar sind.

Plastidenstadium F

Die Plastiden dieses Stadiums stammen aus der Blattbasis voll chlorotischer Blätter vom Typ X. Innerhalb von 61 Tagen Kulturdauer waren die jüngsten chlorotischen Blätter zunächst sekundär ergrünt (vgl. Lamprecht 1961 a, S. 125); nach kurzer Zeit wurden jedoch noch zwei weitere, wieder voll chlorotische Blätter ausgebildet, von denen das jüngere untersucht wurde. Es ist denkbar, daß die abgebildeten Plastiden im Zuge der sekundären Ergrünung zunächst, noch in der Knospe, bis zu einer dem Stadium C entsprechenden Entwicklungsstufe gelangten. Mit dem wieder wirksam werdenden Eisenmangel setzten dann an den Plastiden der inzwischen austreibenden Blätter erste Degenerationserscheinungen ein.

Die Plastiden des Stadiums F können mit folgenden Merkmalen charakterisiert werden:

1. die lamellare Komponente ist, von ersten leichten Schäden abgesehen, deutlich vorhanden;
2. das schaumig-lockere Stroma ist ungleich verteilt; eine Feinstruktur kann nicht näher analysiert werden;
3. im Stroma fallen zahlreiche Gruppen osmiophiler Granula auf.

Die Lamellen erfüllen das Plastideninnere in unregelmäßigen Windungen. An Flächenschnitten sind solche Strukturen nicht zu finden; das kann als Beweis für ihre Lamellennatur angesehen werden, denn nematische Elemente müßten unabhängig von der Schnittrichtung immer in gleicher Weise auftreten. Eine Sichtbarkeit der Lamellen im lichtmikroskopischen Bereich ist nicht zu erwarten; die Plastiden werden im Lichtmikroskop strukturlos erscheinen.

Die Doppelschichtigkeit der Lamellen ist zum Teil erhalten (Abb. 15). Die Lamellen bestehen in diesem Falle aus zwei parallelen, stark elektronenstreuenden Schichten von 40–60 Å Dicke (Streubreite 20–120 Å) und begrenzen helleres, oft sehr lockeres Material. Die Dicke dieser Doppellamellen schwankt recht erheblich; sie mißt 150–300 Å (Streubreite 40–500 Å).



Abb. 15. Plastidenstadium F — Degeneration der chlorotischen Plastiden bei lange anhaltendem Eisenmangel, ableitbar aus den Plastidenstadien B und C. Plastidenlängsschnitt mit einzelnen, teils verklebten Lamellen in unregelmäßiger Windung im schaumig-lockeren und ungleich verteilten Stroma; partielle Entmischung der Lamellen; am oberen Schnitttrand eine Gruppe von fünf osmiophilen Granula (oG). Primärvergrößerung 15.000 : 1; Nachvergrößerung 51.500 : 1.

Abb. 16. Plastidenstadium F — Die partielle Entmischung der Lamellen dieser Plastiden zeigt sich an den perlschnurartig angeordneten Entmischungströpfchen auf den Lamellen. Das Stroma ist fast schaumig. Primärvergrößerung 8000 : 1; Nachvergrößerung 23.500 : 1.

Abb. 17. Plastidenstadium F — Gruppen osmiophiler Granula. Primärvergrößerung 15.000 : 1; Nachvergrößerung 42.000 : 1.

In anderen Schnitten können die Lamellen über lange Strecken hin dunkel und wie verklebt erscheinen. Zahlreiche dunkle Partikeln, die etwa die Breite von Lamellen und eine hohe Elektronenstreuung aufweisen, deuten auf eine partielle Entmischung der Lamellen; sie unterbrechen den Lamellenverlauf oft perlschnurartig (Abb. 16).

Die Plastiden sind von einer doppelten Grenzschrift umgeben. Im Gegensatz zum Stadium E ist das Stroma dieser Plastiden viel stärker von den Entmischungsvorgängen betroffen als die Lamellen (Abb. 15). Oft ist es fast

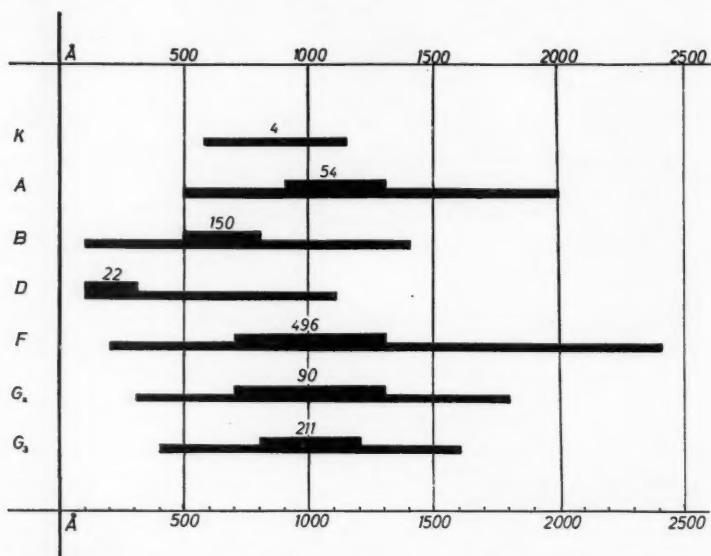


Fig. 2. Durchmesser osmiophiler Granula in erwachsenen Chloroplasten (K) und chlorotischen Plastiden (A—G). Näheres im Text.

schaumig (Abb. 16); immer zeigt es eine ausgesprochen unregelmäßige Verteilung.

Die osmiophilen Granula haben in den Plastiden des Stadiums F eine auffällige Vermehrung erfahren. Meist liegen sie in größeren Gruppen zusammen (Abb. 17, 15 und 16). Sie lassen sich sehr leicht an ihren immer scharf gezogenen, oft annähernd runden Konturen und an ihrer hohen Elektronenstreuung erkennen (S. 180). Zwar kommen sie in allen Chlorosestadien vor, nirgends aber so zahlreich wie hier. Parallel damit erreichen sie im Stadium F auch die größten Durchmesser: der höchste gemessene Wert ergab 2400 Å. Eine Übersicht über die Größen der osmiophilen Granula in den einzelnen Plastidenstadien vermittelt Fig. 2.

Die Durchmesser sind in Å angegeben (zur Erklärung vgl. Fig. 1). In den Plastiden der Stadien A, F und G liegen die Werte für die Durchmesser — bei einer Streuung von ± 200 –300 Å — um 1000 Å. Am kleinsten sind die osmiophilen

Granula in den Plastiden des Stadiums D mit 100–300 Å; allerdings ist auch ihr Vorkommen in diesem Stadium gering.

Über das Auftreten osmiophiler Granula ist in der Literatur immer wieder berichtet worden, über ihre Natur aber bestehen die unterschiedlichsten Auffassungen. Nach Frey-Wyssling (1955) sollen die dicht osmierten Globuli Artefakte aus Niederschlägen von Stroma-Lipoproteinen sein. Jedoch fehlen sie bei gleichem Fixationsgang in einer Reihe anderer Lipoproteinstrukturen (Hodge et al. 1956). Sie treten in erwachsenen Chloroplasten (Leyon 1954, Steinmann and Sjöstrand 1955) ebenso wie in allen Entwicklungsstadien auf (Perner 1956 a und b, Buvat 1958). Sitte (1958) bezeichnet sie als Lipoidtropfen, Buvat (1958) als „globules lipidiques“. Kriger (1957) beobachtete osmiophile Granula auch in etioliierten Plastiden im Stroma und vor allem in den Grana; dagegen sollen sie nach Hodge et al. (1956) bei vollkommenem Etiolement fehlen und erst mit dem Ergrünen auftreten.

Von Wettstein (1957 a) beschreibt ihr Vorkommen in chlorophylldefekten Mutanten der Gerste. In den Endstadien der Plastidenentwicklung einer xantha-3-Mutante finden sich starke Anhäufungen relativ großer osmiophiler Granula (v. Wettstein benutzt den Terminus Globuli und gibt Durchmesser von 500 bis 1400 Å an). Gleichzeitig ist in diesen Stadien der Gehalt an Chlorophyll b um etwa 50% gegenüber vergleichbaren normalen Entwicklungsstadien der Gerste vermehrt. Von Wettstein vertritt die Ansicht, daß in den Globuli seiner Mutante die Plastidenfarbstoffe, zumindest Chlorophyll b, lokalisiert seien. Für diese Deutung führt er das Vorkommen der Globuli als Bausteine der carotinoidreichen Augenflecke der Flagellaten an (Sager and Palade 1954, Abb. 2 und 3, 1957, Abb. 7 und 8, siehe v. Wettstein 1957 a). In den Plastiden der Gerstenmutante ist die Lamellensynthese infolge einer Genmutation blockiert, so daß es zu einer Anhäufung der Globuli im Sinne einer Differenzierungsvorstufe kommt (v. Wettstein 1957 a).

In diesem Zusammenhang ist es besonders interessant, daß in den hier beschriebenen und abgebildeten Stadien chlorotischer Plastiden von *Tradescantia* eine Anhäufung osmiophiler Granula auftritt, obgleich wohl ausgebildete Lamellen vorhanden sind. Es ist anzunehmen, daß die osmiophilen Granula bereits vor Beginn der Entmischung in den Plastiden angelegt wurden.

Mit maximalen Größen von 0,14 μ (Gerstenmutante xantha-3, v. Wettstein 1957 a) bis 0,24 μ (*Tradescantia*, Plastidenstadium F) liegen die osmiophilen Granula noch unterhalb der Grenze des lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens. Von Wettstein glaubt jedoch einen Zusammenhang zwischen den von ihnen gebildeten Gruppen und dem lichtmikroskopisch beobachteten gekörnten Aussehen seiner Plastiden herstellen zu können. Eine entsprechende Erklärung gibt er für die von Strügger und Losada-Villasante (1956) beschriebenen lichtmikroskopischen Grana albicater Plastiden.

Ob die stark lichtbrechenden Einschlüsse, die an degenerativ geschädigten chlorotischen Plastiden von *Tradescantia* lichtmikroskopisch beobachtet

wurden (Lamprecht 1961 a, Abb. 19 und 20), solchen Anhäufungen osmiophiler Granula entsprechen, kann nicht mit Sicherheit entschieden werden. Da über die chemische Zusammensetzung der osmiophilen Granula bisher ebensowenig bekannt ist wie über ihre Funktionen, ist es ungewiß, ob ihre auf starker Osmiophilie beruhende hohe optische Dichte im Elektronenmikroskop einer gleichen optischen Dichte bei lichtmikroskopischen Analysen entspricht.

Plastidenstadium G

Mit dem Plastidenstadium G ist der Endzustand der Eisenmangelchlorose erreicht. In dieser Phase kommt es zu einem vollkommenen Zusammenbruch aller Plastidenstrukturen und außerdem zu einer deutlichen irreversiblen Schädigung aller anderen Zellelemente. Die Abb. 18 zeigt einen Ausschnitt aus einer solchen Mesophyllzelle. Das Material stammt aus chlorotischen Blättern vom Typ X nach 104 Tagen Kulturdauer.

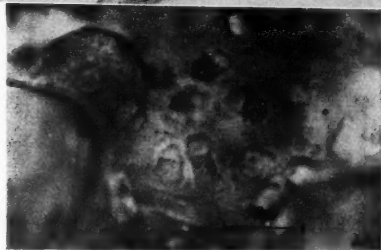
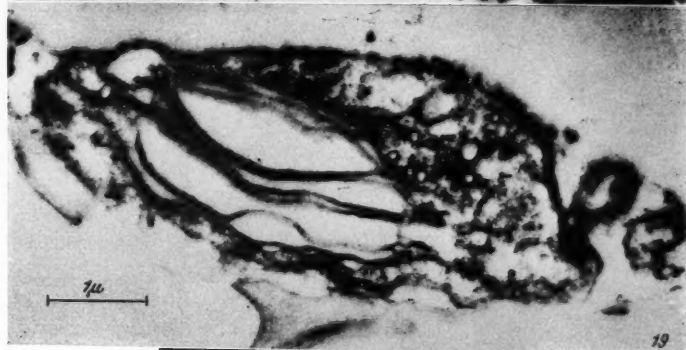
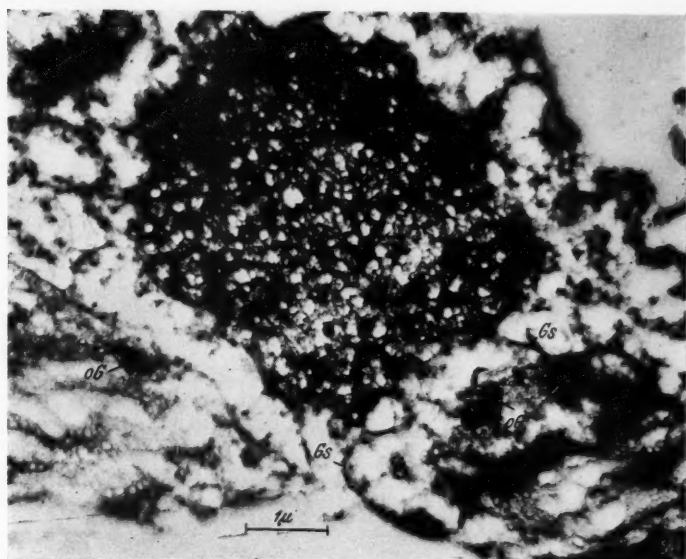
Die Plastiden lassen sich an der doppelten Grenzschicht, den Gruppen osmiophiler Granula und einigen wenigen Lamellenresten gerade noch identifizieren. Das Stroma ist ungleich verteilt und blasig aufgetrieben. Der Kern ist vakuolig degeneriert, die Chondriosomenstruktur und das Cytoplasma sind zerstört. In Plastidenlängsschnitten finden sich manchmal noch letzte Doppellamellen, die für eine Ableitbarkeit dieses Stadiums aus Plastiden des Stadiums B sprechen (Abb. 19); doch ist auch in solchen Fällen eine starke Vakuolisierung des Stromas eingetreten. Bei der lichtmikroskopischen Kontrolle (Abb. 20) fallen die großen Vakuolen, die unregelmäßige Form der Plastiden und ihre ungleich großen dunklen Einschlüsse auf. Die Schädigung des Kernes ist lichtmikroskopisch nicht sichtbar, wenngleich er einen gröber gekörnten Aspekt bietet als in ungeschädigten Zellen. Die elektronenmikroskopisch festgestellten Vakuolen im Kern (Abb. 18) liegen mit $0.05\text{--}0.2\ \mu$ noch unterhalb der Grenze des lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens.

Das Plastid der Abb. 21, ebenfalls aus vollkommen chlorotischen Blättern vom Typ X stammend, läßt sich zufolge weiterer Degeneration aus Plasti-

Abb. 18. Plastidenstadium G — Zerstörung aller Zellstrukturen infolge lange anhaltenden Eisenmangels; Ausschnitt aus einer Mesophyllzelle. In der Bildmitte vakuolig degenerierter Kern, rechts und links unten Ausschnitte von Plastidenresten, erkennbar an ihrer Grenzschicht (Gs) und den Gruppen osmiophiler Granula (oG); Cytoplasma und Chondriosomen zerstört (vgl. Abb. 20). Primärvergrößerung 8000 : 1; Nachvergrößerung 13.000 : 1.

Abb. 19. Plastidenstadium G — Längsschnitt durch ein Plastid mit starken Degenerationserscheinungen vor allem im Stroma; einzelne lange Doppellamellen sind noch erhalten; Vakuolenbildung (vgl. Abb. 20). Primärvergrößerung 8000 : 1; Nachvergrößerung 13.500 : 1.

Abb. 20. Plastidenstadium G — Lichtmikroskopische Kontrolle zu Abb. 18 und 19. Vakuolig degenerierte Plastiden und grob strukturierter Kern als Zeichen für eine weitgehend irreversible Schädigung infolge lange anhaltenden Eisenmangels. Lebend, ungefärbt. Vergrößerung 1250 : 1.



den des Stadiums F ableiten; es zeigt die stärksten beobachteten Degenerationserscheinungen. Die Plastiden sind blasig aufgetrieben, das Stroma ist fast völlig abgebaut. Reste langer Lamellen sind an den Entmischungströpfchen (vgl. Abb. 15 und 16) zu erkennen. Die blasigen Plastidenreste sind oft zerrissen. Das Cytoplasma ist von der Zellwand abgehoben und verbindet als koagulierte Masse die im ehemaligen Wandbelag gelegenen Plastidenreste.

Derartige durch Eisenmangel hervorgerufene Schädigungen müssen als irreversibel angesehen werden und führen zum Tode der Zelle.

Abschließender Vergleich

Bei einem abschließenden Vergleich der mit zunehmender Eisenmangelchlorose auftretenden Strukturänderungen der Plastiden ist festzustellen, daß zunächst das Verhältnis der Lamellen zum Stroma geändert wird.

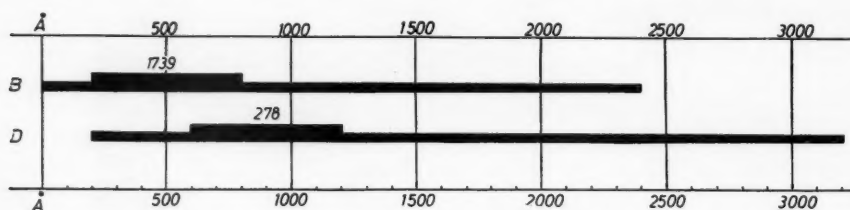


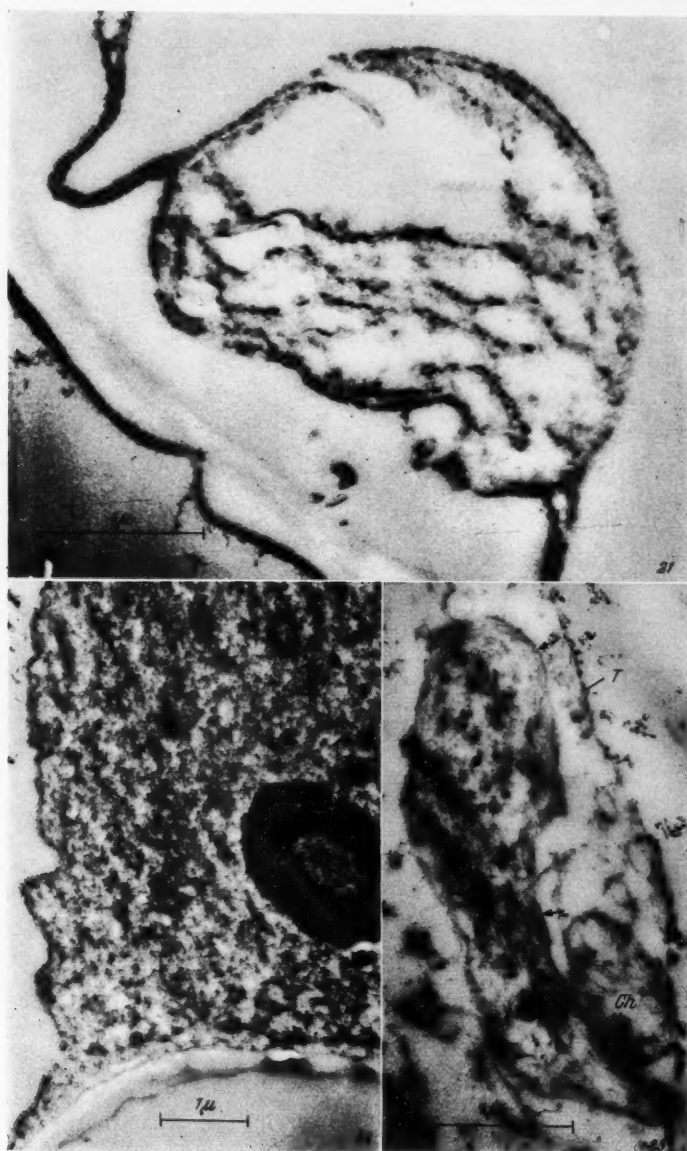
Fig. 3. Zunahme des Stromaanteils in chlorotischen Plastiden bei zunehmender Eisenmangelwirkung. Näheres im Text.

Der Stromaanteil ausdifferenzierter Chloroplasten in Kontrollpflanzen ist gering. Mit zunehmendem Chlorosegrad nimmt sein relativer Mengenanteil immer mehr zu (A—B—C), um in maximal chlorotisch gehemmten Stadien (D—E) das gesamte Plastid zu erfüllen. Die Zunahme des Stromaanteils im Plastidenstadium D gegenüber dem Plastidenstadium B zeigt Fig. 3 (zur Erklärung vgl. Fig. 1 und 2).

Abb. 21. Plastidenstadium G — Stärkste Degenerationserscheinungen an chlorotischen Plastiden. Plastid blasig aufgetrieben, Lamellenreste mit Entmischungströpfchen, Stroma zerstört. Ableitbar aus Plastidenstadium F. Plasma koaguliert und von der Zellwand abgehoben. Primärvergrößerung 8000 : 1; Nachvergrößerung 26.000 : 1.

Abb. 22. Kern mit median geschnittenem Nucleolus aus dem Mesophyll eines Blattes vom Vergilbungstyp X, das Plastiden des Stadiums D enthielt (vgl. Abb. 10—15). Näheres im Text. Primärvergrößerung 8000 : 1; Nachvergrößerung 14.000 : 1.

Abb. 23. Chondriosomen aus dem Mesophyll eines Blattes vom Vergilbungstyp X, das Plastiden des Stadiums D enthielt (vgl. Abb. 22). *Ch* Querschnitt durch ein Chondriosom; links daneben ein großes, längs geschnittenes Chondriosom mit ringförmigen und länglichen Anschnitten der Tubuli und doppelter Chondriosomen-grenzschicht (Pfeile); *T* Grenzschicht des Plasmastranges gegen die Vakuole. Primärvergrößerung 8000 : 1; Nachvergrößerung 24.500 : 1.



Die lamellare Komponente erfüllt in den Chloroplasten der Kontrollen nahezu den ganzen zentralen Innenraum. Mit dem Eisenmangel setzt eine Hemmung in der Ausdifferenzierung des Lamellenkörpers ein: eine schwache Hemmung in einem späten Differenzierungsstadium führt zunächst zu Plastiden mit isolierten Sekundärgrana (A), die dem Bild des Mais-Chloroplasten entsprechen; bei zunehmender Hemmung resultieren Plastiden mit einzelnen Lamellenlagen (B) oder Lamellen (C) ohne Sekundärgranastruktur, die der phylogenetischen Entwicklungsstufe der Algendromatophoren vergleichbar sind. Die Werte für die Dicken der Lamellen liegen in diesen Plastidenstadien in der gleichen Größenordnung.

Bei länger anhaltendem Eisenmangel jedoch wirkt sich die Differenzierungshemmung auch auf die Struktur der einzelnen Lamellen aus. Statt der bislang noch ausgebildeten langen Lamellen weisen die Plastiden nun kürzere oder längere Lamellenstücke auf (D); diese sind zwar auch aus drei Feinschichten aufgebaut, ihre Innenschicht kann jedoch stark verquellen. Die Lamellenstücke sind ausgesprochen labil. Sie unterliegen daher einer in diesem Plastidenstadium (D) eintretenden Degeneration eher als das Stroma (E). Demgegenüber wirken sich Degenerationserscheinungen an Plastiden der Stadien B und C zunächst auf das Stroma aus (F), obgleich auch die stabileren Lamellen dieser Stadien später einer Entmischung anheimfallen (G).

Es muß jedoch betont werden, daß der einmal von einem Plastid erreichte Differenzierungsgrad so lange beibehalten wird, bis das Plastid infolge der Störung des ganzen Zellstoffwechsels degenerativ geschädigt wird. Eine Rückdifferenzierung einzelner Plastiden findet nicht statt. Die beschriebenen Strukturänderungen (A–D) beziehen sich auf die Plastidengarnituren der verschiedenen chlorotischen Gewebe, die in der Reihenfolge zunehmender Eisenmangelwirkung miteinander verglichen wurden. Sie entsprechen einer von Stufe zu Stufe stärker werdenden Hemmung der Plastidenentwicklung. Wenn man von einer bei Eisenmangel eintretenden Reduktion der Plastiden spricht, so hat man diese Reduktion jedenfalls nicht als einen sekundären Abbau hochdifferenzierter Plastiden anzusehen. Die Struktur der chlorotischen Plastiden ergibt sich als Folge einer Reduktion des Differenzierungsvermögens von Proplastiden zu Chloroplasten.

Ausbildung von Kern- und Plasmastrukturen in chlorotischen Zellen

Eine Einwirkung des Eisenmangels auf die Struktur von Kern, Chondriosomen und Cytoplasma kann zunächst nicht festgestellt werden. Zellen, die Plastiden des Stadiums D aufweisen, besitzen vollkommen intakte Arbeitskerne (Abb. 22) und weitgehend normal ausgebildete Chondriosomen (Abb. 23). In diesen Chondriosomen chlorotischer Gewebe sind innere Membransysteme allerdings nur in verhältnismäßig geringer Anzahl ausgebildet (Abb. 12, 13 und 23), eine Tatsache, die vielleicht mit den durch Eisenmangel hervorgerufenen Stoffwechselstörungen (besonders enzymatischer

Natur, Cytochrome!) in Zusammenhang steht; auf Strukturänderungen der Chondriosomen während der Zelldifferenzierung, in stoffwechselaktiven und in alternden Zellen haben Buvat (1958) und Buvat et Lance (1958) aufmerksam gemacht.

Bei lange anhaltendem Eisenmangel tritt jedoch eine so starke Störung des gesamten Zellstoffwechsels ein, daß auch Plasma, Kerne und Chondriosomen irreversibel geschädigt werden und die Zellen absterben (Abb. 18 und 21).

Diskussion

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß nicht die fehlende Chlorophyllsynthese allein das äußerlich sichtbare Bild der Chlorose bedingt. Offenbar kommt es, wie Frey-Wyssling, Ruch und Berger (1956) annehmen, bei Eisenmangel zu einer „mangelhaften Synthese des spezifischen Lipoproteids, an welches das Chlorophyll gebunden wird“. An Mangelkulturen mit *Tradescantia* zeigte sich, daß sich der Eisenmangel hemmend auf das Wachstum des Plastidenplasmas und auf das Differenzierungsvermögen der Plastiden auswirkt, so daß es nicht zur Ausbildung der normalen Chloroplastenstruktur kommt. Möglicherweise wird die Ausdifferenzierung der Plastiden in den jungen Blättern und in den Blattanlagen des Vegetationskegels überhaupt unterbrochen, wenn der Eisenmangel in diesen Geweben wirksam wird. Da das in den Pflanzen vorhandene Eisen aus lebendem Gewebe nicht mehr abtransportiert wird, wenn es einmal in den Blättern festgelegt ist (Bear 1949), wirkt sich der Eisenmangel vor allem an den jungen Pflanzenteilen aus. Die Plastiden der betroffenen Gewebe bleiben dann auf der Differenzierungsstufe stehen, die sie gemäß ihrem Alter bis zu diesem Zeitpunkt erreicht haben. Die neuentfalteten Blätter besitzen von Blatt zu Blatt schwächer differenzierte Plastiden. Der Höhepunkt der Chlorose ist lichtmikroskopisch mit Plastiden der Abb. 15–17 (Lamprecht 1961 a) bzw. elektronenmikroskopisch mit dem Stadium D (Abb. 13) erreicht; bei maximaler Hemmung ihres Entwicklungsvermögens besitzen diese Plastiden noch die Fähigkeit, zu ergrünen und zu normalen Chloroplasten heranzuwachsen. Die Degenerationserscheinungen, die den Chloroseendzustand charakterisieren (Plastidenstadien E–F–G), müssen als sekundäre Folge der Störung des gesamten Stoffwechsels angesehen werden.

Diese Störungen wirken sich nicht nur auf den Chlorophyllgehalt aus, der nach Burghardt (1956) 16% der Kontrollen beträgt, sondern auch auf die übrigen Blattfarbstoffe (Carotin 25%; Xanthophyll 43%; Burghardt 1956). Daraus läßt sich, ebenso wie aus den Ergebnissen der Chlorophyllchemie und einigen Untersuchungen über den Stickstoffhaushalt eisenmangelkranker Pflanzen, auf eine allgemeine Beeinflussung des gesamten Chloroplasten schließen. Das Eisen spielt weder als Konstituent des Chlorophylls noch früher Chlorophyllvorstufen eine Rolle; jedoch wird mit einer fermentativen Eisenkatalyse im Bereich des gemeinsamen Syntheseweges von Häminen und Chlorophyllen gerechnet (Pirson 1958, S. 369, Calvin

1959). Granick (1951) stellte fest, daß die Synthese beider Porphyrinderivate bis zum Protoporphyrin IX gemeinsam verläuft.

Abgesehen von den Pigmentgehalten werden durch Eisenmangel auch zahlreiche andere Komponenten des pflanzlichen Stoffwechsels gestört. Der Eiweißstoffwechsel wird zugunsten von Eiweißspaltprodukten verschoben. Untersuchungen von Gärtner (1937), Sideris and Young (1956) u. a. sprechen für Zusammenhänge zwischen Pigmentbildung und Eiweißsynthese. Holley and Cain (1955) stellten in eisenmangelkranken Pflanzen starke Anhäufungen von Arginin fest. Darüber hinaus beobachteten De Kock and Morrison (1958 a) auch eine Erhöhung des Histidingehaltes; bei Pteridophyten waren sogar fast alle freien Aminosäuren mengenmäßig vermehrt. Derartige Verschiebungen des N-Stoffwechsels kranker Pflanzen entdeckte als erster Iljin (1942) für die Kalkchlorose, die der Eisenmangelchlorose physiologisch in mancher Hinsicht nahesteht; solche Pflanzen enthalten eine Menge löslicher Stickstoffverbindungen, wie Aminosäuren, Amide, Basen und lösliche Albumine (Iljin 1942, 1943 a, b, 1944, 1948, 1959). Außerdem stellte Iljin in kalkchlorosekranken Pflanzen eine beachtliche Steigerung der Zitronensäurebildung fest, während die Apfelsäuresynthese bei starker Chlorose unterdrückt war (Iljin 1942, 1943 b, 1948, 1959). Entsprechende Beobachtungen über die Säurezusammensetzung kranker Pflanzen machten McGeorge (1949) an Kalkchlorosepflanzen und De Kock and Morrison (1958 b) an Eisenmangelpflanzen.

Es war naheliegend, für die Chlorosesymptome bei Eisenmangel den Eisenstatus in der Pflanze verantwortlich zu machen (Literatur bei Baumeister 1958 und 1959). Es zeigte sich jedoch, daß zwischen verschiedenen physiologischen Zuständen des Eisens in der Pflanze unterschieden werden muß. 82% des Gesamteisens der Pflanzenzellen sind in den Chloroplasten lokalisiert (Liebich 1941). Davon sind 60% fest an phosphorhaltige Eiweißstoffe und Nucleinsäuren gebunden. Über die Bedeutung der einzelnen Eisenfraktionen für die Chlorophyllsynthese und den Chloroplastenaufbau liegen keine sicheren Befunde vor.

Parallel mit der Hemmung der Chlorophyllsynthese und des Chloroplastenaufbaues ist auch die Aktivität verschiedener Oxydationsfermente, vor allem der Katalase, gehemmt. Da es sich bei den prothetischen Gruppen dieser Fermentsysteme um Häminderivate handelt, ist ein starkes Absinken ihrer Aktivitäten bei Eisenmangel (Brown and Hendricks 1952, Nason, Oldewurtel and Probst 1952, Weinstein and Robbins 1955) nicht verwunderlich. Mit dem Ausfall dieser Fermentsysteme sind Störungen des Zellstoffwechsels in ihrem jeweiligen Wirkungsbereich verbunden. Über die Cytochrome, von denen Cytochrom f in den Chloroplasten lokalisiert ist (Granick 1955), wird die aerobe Atmung beeinflusst; das wirkt sich auf die gesamten Atmungsvorgänge (Baumeister 1958, S. 543) sowie auf den oxydativen Zellstoffwechsel aus (Granick 1955). Die Katalase kommt zum größten Teil in den Chloroplasten vor (v. Euler und Bergmann 1953, v. Euler 1951). Sie hat vor allem die Aufgabe, das während der Zellatmung entstehende H_2O_2 durch Spaltung unschädlich zu machen; bei geringen Peroxydkonzentrationen ist die Kata-

lase jedoch auch zu einer Übertragung des Peroxydsauerstoffes auf organische Substrate wie niedere Alkohole befähigt (Peroxydasewirkung der Katalase; Calvin 1959). Da die Katalaseaktivität auf Grund des Eisenmangels vermindert wird, ist eine Anhäufung von H_2O_2 und eine oxydative Zerstörung des Porphyrinkernes der Chlorophylle denkbar. Eine solche zerstörende Wirkung von H_2O_2 bei Katalasehemmung hat Bingold für Hämoglobin festgestellt (Lehnartz-Flaschenträger 1951, S. 316), das in Pentdyopent umgewandelt wird. Noack (1944) nimmt für den Chlorophyllabbau beim Vergilben des Blattes ebenfalls eine oxydative Katalyse durch H_2O_2 an: H_2O_2 wird bei abnehmender Katalasewirkung angehäuft und greift an Spaltprodukten des Chlorophylls an; dabei wird allerdings die Mitwirkung dreiwertigen Eisens aus den Chloroplasten als Katalysator angenommen.

Auf die Bedeutung des Eisens für die Prozesse der oxydativen Phosphorylierung (Calvin 1956, 1959) sei hier nur kurz hingewiesen.

Ein Absinken der Katalaseaktivität ist auch für chlorophylldefekte Mutanten der albina-Gruppe (v. Euler und Bergmann 1953, v. Euler 1951, Eyster 1950) und einige Panaschen (v. Euler 1951) beschrieben worden.

Ein Vergleich mit albina-Mutanten wirft ein interessantes Licht auf die Chloroplastenfrage. Abgesehen von der Katalaseaktivität sind auch andere Stoffwechselkomponenten verändert. v. Euler (1951) fand in albina-Mutanten neben einer Herabsetzung von Proteinstickstoff eine Erhöhung des Aminostickstoffes. Solche albina-Mutanten besitzen stark reduzierte, vakuolig degenerierte Plastiden (v. Euler und Bergmann 1953). Von Euler hält die Chloroplastendegeneration für die primäre Ursache des Chlorophyllmangels. Dagegen sollen nach v. Wettstein (1957a) die Chlorophylle für die Lamellenbildung notwendig sein. Die von ihm abgebildeten Plastiden einer albina-Mutante der Gerste entstehen durch eine primäre Blockierung der Plastidenentwicklung auf Grund einer Faktormutation. Sie sind zu einer bedeutenden Substanzvermehrung befähigt, kommen aber über die frühesten Stadien ihrer Entwicklung nicht hinaus; im Endzustand zerfallen sie ohne Vakuolisationserscheinungen. Ein sekundärer Abbau zunächst ausdifferenzierter Chloroplasten soll zu den Plastiden der xantha-Mutanten führen (v. Wettstein 1957a). Solche Mutanten besitzen nach v. Euler und Bergmann (1953) große Chloroplasten von unregelmäßiger Form. Auf Grund von Untersuchungen an einer UV-induzierten Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* vertreten auch Sager und Zalokar (1958) die Ansicht, daß Chlorophyll für die Ausbildung der Lamellenstruktur der Chloroplasten notwendig sei: die Reduktion der Lamellenzahl in den Chloroplasten der Mutante (auf etwa $\frac{1}{20}$ der Stammform) entspricht annähernd der Reduktion des Chlorophyllgehaltes ($\frac{1}{13}$), nicht aber derjenigen des Carotinoidgehaltes ($\frac{1}{200}$ der normal pigmentierten Ausgangsform).

Die Differenzierungshemmung in albina-Mutanten führt zu ähnlichen Plastidenformen wie starker Eisenmangel. Eine Hemmung der Chloroplastensynthese als Folge mangelhafter Eisenzufuhr erscheint daher denkbar.

Das ganze Chloroseproblem ist viel zu komplex, als daß es mit Hilfe einzelner — naturgemäß isoliert zu betrachtender — Faktoren gelöst werden könnte. Über die Fermentsysteme ist der gesamte Stoffwechsel gestört. Die verminderte Photosynthese einerseits und der Ausfall wichtiger Fermentsysteme andererseits bedingen eine mangelhafte Ausbildung des Assimilationsapparates, nämlich der Chloroplasten und ihrer Farbstoffkomponenten, und führen zu dem makroskopisch sichtbaren Bild der Eisenmangelchlorose.

Werden die noch nicht degenerativ geschädigten chlorotischen Plastiden als in ihrer Entwicklung gehemmte jugendliche Differenzierungsformen aufgefaßt, so können aus der zunehmenden Reduktion ihres Differenzierungsvermögens umgekehrt eventuell Schlüsse auf Stufen ihrer normalen Entwicklung gezogen werden.

Die Plastiden des Stadiums D sind, da sie aus ergrünendem chlorotischen Gewebe stammen, vital und voll differenzierungsfähig. In ihnen sind entweder nur kurze Lamellenstücke oder mäßig lange Lamellen vorhanden. Die Verquellung der Innenschicht dieser Lamellenstücke wird auf reversible Schäden durch den Eisenmangel zurückgeführt. Die etwas schwächer bzw. in ihrer ontogenetischen Entwicklung später gehemmten Plastiden des Stadiums C besitzen einzelne lange Lamellen des normalen dreischichtigen Feinbaues. Können sich die Plastiden vor dem Beginn der Eisenmangelwirkung noch weiter differenzieren, so erreichen sie mit dem Stadium B die Stufe der Algenchromatophoren: lange Lamellenlagen mit ersten Ansätzen zur Sekundärgranabildung durchziehen das stromareiche Plastid, das chlorophyllhaltig und assimilationstüchtig ist. Die Plastiden des Blatttyps A konnten sich vor Beginn der Mangelwirkung bis fast zu normaler Größe entwickeln. Sie besitzen isolierte Sekundärgrana und stellen die Differenzierungsstufe der Mais-Chloroplasten dar. In normal ernährten Pflanzen bzw. in den Blättern der Typen II—IV, die schon bei Eisenmangelbeginn ausdifferenzierte Plastiden besaßen, ist der Differenzierungsgrad der *Aspidistra*-Chloroplasten mit durchgehenden Granasäulen in Form von Geldrollen (Strugger 1951) verwirklicht.

Problematisch ist die Frage, wie sich aus den kurzen Lamellenstücken der ergrünungsfähigen Plastiden des Stadiums D beim Ergrünen die langen Lamellen der Stadien C und B bilden. Nach Heitz (1957) entstehen die Stromalamellen der Plastiden im Wurzelmeristem von *Vicia faba* aus der reihenmäßigen Zusammenlagerung kleiner rundlicher bis ovaler Bläschen mit zarter Membran. Hodge et al. (1956) diskutieren einen ähnlichen Bildungsmechanismus für pflanzliche Lamellensysteme: die Lamellen sollen, zum Beispiel beim Ergrünen etiolierter Plastiden, durch das Zusammenfließen kleiner bläschenartiger Strukturen zustandekommen, die von diesen Autoren als Cisternae bezeichnet werden. Offenbar findet auch beim Ergrünen chlorotischer Plastiden eine Zusammenlagerung der Lamellenstücke zu langen Lamellen statt, wofür die lagenmäßige Anordnung der Lamellenstücke sprechen könnte. Bei der normalen Ausdifferenzierung der Gersten-Chloroplasten vollzieht sich die Lamellenbildung nach dem gleichen Modus (v. Wettstein 1957 a).

Systematische Untersuchungen über die Ergrünung chlorotischer Plastiden können sicherlich auch für das Studium der normalen Plastidendifferenzierung neue Möglichkeiten eröffnen.

An Hand der Untersuchungen ausgewachsener chlorotischer Blätter allein kann die Frage nach der Entstehung chlorotischer Plastiden naturgemäß nicht geklärt werden. Umfangreiche Reihenuntersuchungen eisenmangelkranker Pflanzen vom Meristem bis zu den ausgewachsenen Blättern würden vermutlich näheren Aufschluß über diese Frage bringen und damit einen weiteren Beitrag zum Problem der Eisenmangelchlorose liefern.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Das Eisen beeinflusst nicht nur den Chlorophyllgehalt, sondern auch die Struktur der Plastiden der grünen Pflanzen.

2. Eisenmangel wirkt sich hemmend auf das Wachstum des Plastidenplasmas und die Differenzierungsfähigkeit der Plastiden des Blattmesophylls aus.

3. Die Hemmung der Plastidendifferenzierung nimmt mit anhaltendem Eisenmangel zu. Sie äußert sich in einer starken Größenabnahme, einem von Stufe zu Stufe geringeren Differenzierungsgrad und einer zunehmenden Amöboidie der chlorotischen Plastiden.

a) Zu Beginn der Mangelkultur werden weitgehend normale Chloroplasten ausgebildet, die Chlorophyll führen und zahlreiche Grana besitzen. Sie entsprechen im elektronenmikroskopischen Bereich entweder den Chloroplasten der Kontrollpflanzen und stellen den Typ des *Aspidistra*-Chloroplasten mit durchgehenden Granasäulen dar, oder sie haben in schwach chlorotischen Geweben eine Differenzierungsstufe erreicht, die mit deutlicher Lagenstruktur und isolierten Sekundärgrana dem Typ des Mais-Chloroplasten entspricht.

b) Bei anhaltendem Eisenmangel sind die Plastiden in den hellgelben bis farblosen chlorotischen Geweben im lichtmikroskopischen Bereich zum größten Teil homogen und meist vollkommen chlorophyll- und stärkefrei. Seltener sind stark lichtbrechende Einschlüsse im amöboiden, farblosen Stroma ausgebildet, die sich durch ihre Affinität zu basischen Farbstoffen als Grana identifizieren lassen. Bei hochgradigem Eisenmangel können unigranuläre Stadien auftreten. Die Teilung des Granums in einem solchen chlorotischen Plastid wurde *in vivo* beobachtet.

c) In den gleichen Geweben macht sich im elektronenmikroskopischen Bereich zunächst eine Verschiebung des Verhältnisses Stroma/Lamellen zugunsten des Stromas bemerkbar: es entstehen Plastiden mit langen Lamellen ohne Sekundärgrana, dem Typ der Algenchromatophoren vergleichbar, oder Plastiden mit einzelnen langen Lamellen im amöboiden Stroma.

Bei anhaltendem starken Eisenmangel wirkt sich die Differenzierungshemmung auch auf die Struktur der Lamellen aus: in stromareichen amöboiden Plastiden werden kurze Lamellenstücke in oft lagenmäßiger Anordnung ausgebildet.

Alle diese Plastiden sind vital und ergrünen bei Eisenzufuhr zu normalen Chloroplasten.

4. Die Lamellen und Lamellenstücke zeigen einen dreischichtigen Feinbau.

5. Der einmal von den Plastiden erreichte Differenzierungsgrad wird so lange beibehalten, bis die Plastiden infolge der tiefgreifenden Störungen des gesamten Zellstoffwechsels bei lange anhaltendem Eisenmangel degenerativ geschädigt werden. Eine Rückdifferenzierung einzelner Plastiden findet nicht statt.

6. Die Leukoplasten der Epidermis und die Chloroplasten der Spaltöffnungen werden durch Eisenmangel nicht sichtbar beeinflusst.

7. Das Plasma und die übrigen Zellorganelle sind in Zellen mit ergrünungsfähigen chlorotischen Plastiden ungeschädigt und normal ausgebildet; erst mit dem Auftreten von Degenerationserscheinungen an den chlorotischen Plastiden werden auch sie irreversibel geschädigt.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. S. Strugger, sei für die Anregung zu diesen Untersuchungen sowie für das stete fördernde Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, an dieser Stelle aufrichtig gedankt.

Literatur

- Bahr, G. F., 1954: Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reaction with biologically important substances. *Exper. Cell Res.* 7, 457.
- Baumeister, W., 1958: Die Hauptnährstoffe. In: Ruhland, Handbuch der Pflanzenphysiol., Band IV, 482, Springer 1958.
- 1959: Die Bedeutung des Eisens für die höhere Pflanze. *Pharmaz. Rdsch.* 1, 14.
- Bear, F. E., 1949: Hunger signs in crops. A symposium. The Amer. Soc. of Agronomy and the Nation. Fertilizer Assoc., Washington 1949.
- Brown, J. C., and S. B. Hendricks, 1952: Enzymatic activities as indications of copper and iron deficiencies in plants. *Plant Physiol.* 27, 651.
- Burghardt, H., 1956: Beiträge zum Eisen-Mangan-Antagonismus der Pflanzen. *Flora* 143, 1.
- Buvat, R., 1958: Recherches sur les infrastructures du cytoplasme, dans les cellules du méristème apical, des ébauches foliaires et des feuilles développées d'*Elodea canadensis*. *Ann. Sci. natur. Botan., Sér. 11*, 19, 121.
- et A. Lance, 1958: Évolution des infrastructures de mitochondries au cours de la différenciation cellulaire. *C. r. acad. sci.* 247, 1130.
- Calvin, M., 1956: Die chemische Evolution und der Ursprung des Lebens. *Naturwiss.* 43, 387.
- 1959: Evolution of Enzymes and the Photosynthetic Apparatus. *Science* 150, 1170.
- Cohen, M., and E. Bowler, 1955: Lamellar structure of the tobacco chloroplast. *Protoplasma* 42, 414.
- DeKock, P. C., and R. I. Morrison, 1958 a: The metabolism of chlorotic leaves. I. Amino acids. *Biochem. J.* 70, 266.
- 1958 b: The metabolism of chlorotic leaves. II. Organic acids. *Biochem. J.* 70, 272.
- Euler, H. v., 1951: Chlorophylldefekte Mutanten. *Festschr. Akad. Wiss. Göttingen* 1951, S. 125.

- Euler, H. v., und B. Bergmann, 1953: Chromatophorendegeneration in Laubblättern von chlorophylldefekten Gersten-Mutanten. Ber. dtsch. bot. Ges. 51, 285.
- Eyster, H. C., 1950: Catalase activity in chloroplast pigment deficient types of corn. Plant Physiol. 25, 630.
- Frey-Wyssling, A., 1953: Pflanzenzytologie und Elektronenmikroskop. Endeavour 14, 54.
- und K. Mühlethaler, 1949: Über den Feinbau der Chlorophyllkörner. Vjschr. Naturforsch. Ges. Zürich, 94, 179.
- F. Ruch und X. Berger, 1956: Monotrope Plastidenmetamorphose. Protoplasma 45, 97.
- Gärtner, H., 1937: Untersuchungen über den Stickstoffwechsel bei Ammon- und Nitraternährung in seiner Beziehung zum Eisen. Bodenkd. u. Pflanzenernährg. 5, 234.
- Granick, S., 1951: Biosynthesis of chlorophyll and related pigments. Ann. Rev. of Plant Physiol. 2, 115.
- 1955: Plastid structure, development and inheritance. In: Ruhland, Handb. der Pflanzenphysiol., Band I, 507. Springer 1955.
- Heitz, E., 1937: Die Struktur der Chondriosomen und Plastiden im Wurzelmeristem von *Zea Mays* und *Vicia Faba*. Z. Naturforsch. 12 b, 285.
- Hodge, A. J., J. D. McLean, and F. V. Mercer, 1955: Ultrastructure of the lamellae and grana in the chloroplasts of *Zea Mays* L. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. 1, 605.
- 1956: A possible mechanism for the morphogenesis of lamellar systems in plant cells. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. 2/2, 597.
- Holley, R. W., and J. D. Cain, 1955: Accumulation of arginine in plants, afflicted with iron-deficiency. Science (Lancaster, Pa.) 121, 172.
- Iljin, W. S., 1942: Die Kalkchlorose der Pflanzen und ihre Biochemie. Jb. wiss. Bot. 90, 464.
- 1943 a: Biochemische Vorgänge während der Kalkchlorose der weißen Lupine. Ber. dtsch. bot. Ges. 61, 158.
- 1943 b: Der Stoffwechsel der Weinrebe während der Kalkchlorose. Gartenbauwissenschaft 17, 538.
- 1944: Der Stoffwechsel des Stickstoffs bei der Kalkchlorose der Pflanzen. Jb. wiss. Bot. 91, 404.
- 1948: Der biochemische Typus der Pflanzen und die Diagnose der Krankheit. Planta 35, 701.
- 1959: Summary of the Scientific Works Published by Prof. Dr. W. S. Iljin. Protoplasma 50, 516.
- Kruger, L., 1957: Cytomorphologische Untersuchungen an etiolierten Plastiden. Dissertation Münster.
- Küster, E., 1956: Die Pflanzenzelle. Die Plastiden: S. 334. Jena 1956, 3. Auflage.
- Lamprecht, I., 1961 a: Die Feinstruktur der Plastiden von *Tradescantia albiflora* (Kth.) bei Eisenmangelchlorose. I. Lichtmikroskopische Untersuchungen. Protoplasma 53, 118.
- und R. Müller-Spieckermann, 1961: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entwicklung der Chloroplasten von *Cabomba furcata* Schult. (In Vorbereitung.)
- Lehnartz-Flaschenträger, 1951: Physiologische Chemie. Ein Lehr- und Handbuch. Bd. I, Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1951.

- Leyon, H., 1954: The structure of chloroplasts IV. The development and structure of the *Aspidistra* chloroplast. *Exper. Cell Res.* 7, 265.
- und D. v. Wettstein, 1954: Der Chromatophoren-Finbau bei den *Phaeophyceen*. *Z. Naturforsch.* 9 b, 471.
- Liebich, H., 1941: Quantitativ-chemische Untersuchungen über das Eisen in den Chloroplasten und übrigen Zellbestandteilen von *Spinacea oleracea*. *Z. Botan.* 37, 129.
- McGeorge, W. T., 1949: Lime-induced chlorosis: Relation between active iron and citric and oxalic acids. *Soil Sci.* 68, 381.
- Menke, W., 1957: Artefakte in elektronenmikroskopischen Präparaten. I: Anisotrope Volumänderungen von Chloroplasten. *Z. Naturforsch.* 12 b, 654.
- 1959: Zur Entwicklungsgeschichte der Plastiden von *Oenothera Hookeri* und Morphogenese der Chloroplastenstruktur. (2. Mittl. zur Entwicklungsgeschichte der Plastiden.) *Z. Naturforsch.* 14 b, 394.
- Nason, A., H. A. Oldewurtel, and L. M. Probst, 1952: Role of micro-nutrient elements in the metabolism of higher plants. I. Changes in oxydative enzyme constitution of tomato leaves deficient in micronutrient elements. *Arch. Biochem.* 38, 1.
- Noack, K., 1944: Über den biologischen Abbau des Chlorophylls. *Biochem. Z.* 316, 166.
- Perner, E. S., 1956 a: Die ontogenetische Entwicklung der Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. I. Die Persistenz des Primärgranums und seine fragile Kristallgitterstruktur im Proplastid. *Z. Naturforsch.* 11 b, 560.
- 1956 b: Die ontogenetische Entwicklung der Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. II. Das Verhalten der Proplastiden bei der Entwicklung zu Jungchloroplasten. *Z. Naturforsch.* 11 b, 567.
- Pirson, A., 1958: Mineralstoffe und Photosynthese. In: Ruhland, Handbuch der Pflanzenphysiol., Band IV, 355, Springer 1958.
- Sager, R., and G. E. Palade, 1954: Chloroplast structure in green and yellow strains of *Chlamydomonas*. *Exper. Cell Res.* 7, 584.
- — 1957: Structure and development of the chloroplast in *Chlamydomonas*. I. The normal green cell. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 3/1, 463.
- and M. Zalokar, 1958: Pigments and photosynthesis in a carotenoid-deficient mutant of *Chlamydomonas*. *Nature* 182, 98.
- Senn, G., 1908: Die Gestalts- und Lageveränderungen der Pflanzenchromatophoren. W. Engelmann, Leipzig 1908.
- Sideris, C. P., and H. Y. Young, 1956: Pineapple chlorosis in relation to iron and nitrogen. *Plant Physiol.* 51, 211.
- Sitte, P., 1958: Die Ultrastruktur von Wurzelmeristemzellen der Erbse (*Pisum sativum*). Eine elektronenmikroskopische Studie. *Protoplasma* 49, 447.
- Steinmann, E., and F. S. Sjöstrand, 1955: The ultrastructure of chloroplasts. *Exper. Cell Res.* 8, 15.
- Strugger, S., 1951: Die Strukturordnung im Chloroplasten. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 64, 69.
- 1956 a: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 69, 177.
- 1956 b: Die Uranylazetat-Kontrastierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen. *Naturwiss.* 43, 337.
- 1956 c: Schraubig gewundene Fäden als sublichtmikroskopische Bauelemente des Zytoplasmas. *Naturwiss.* 43, 451.

- Strugger, S., 1957 a: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Proplastiden des Vegetationskegels von *Elodea densa*. *Protoplasma* 48, 360.
- 1957 b: Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Teilung der Proplastiden im Urmeristem der Wurzelspitze von *Allium cepa*. *Z. Naturforsch.* 12 b, 280.
- 1957 c: Schraubig gewundene Fäden als sublichtmikroskopische Strukturelemente des Cytoplasmas. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 70, 91.
- 1957 d: Die sublichtmikroskopische Struktur des Cytoplasmas bei verschiedener Fixation. *Naturwiss.* 44, 543.
- und M. Losada-Villasante, 1956: Die Plastiden in den albicaten Geweben der Blätter einer mediovariegaten Form von *Chlorophytum comosum*. *Protoplasma* 45, 540.
- und L. Kriger, 1960: Untersuchungen über die Struktur der Plastiden etiolierter Pflanzen. *Protoplasma* 52, 230.
- Weinstein, L. H., and W. R. Robbins, 1955: The effect of different iron and manganese nutrient levels on the catalase and cytochrome oxydase activities of green and albino sunflower leaf tissues. *Plant Physiol.* 50, 27.
- Wettstein, D. v., 1957 a: Chlorophyll-Letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. *Exper. Cell Res.* 12, 427.
- 1957 b: Genetics and the submicroscopic cytology of plastids. *Hereditas* 43, 303.

Anschrift des Verfassers: Dr. Ingrun Lamprecht, Köln-Vogelsang, Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung.

Die Entwicklung von *Lophocolea*-Arten nach einer kurzzeitigen Plasmolysebehandlung

Von

Z. Pavletić und H. Lieth

Botanisches Institut der Naturwissenschaftlichen Fakultät Zagreb und Botanisches
Institut der Landwirtschaftlichen Hochschule Stuttgart/Hohenheim

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. April 1960)

Einleitung

Versuche über das Verhalten pflanzlichen Gewebes nach einer Plasmolyse- und anschließender Deplasmolysierung sind in zweifacher Hinsicht interessant.

Einmal sind solche Versuche notwendig für die Beurteilung von wiederholt an der gleichen Zelle vorgenommenen Plasmolysen, da es nicht sicher ist, ob eine Zelle nach der ersten Plasmolyse noch normal lebensfähig ist. Dies wäre ein Beitrag zur Diskussion über die nichtosmotische Wasseraufnahme zwischen Bogen und Höfler, sowie deren Mitarbeitern und Schülern (ausführliches Literaturverzeichnis bei Höfler und Url 1957). Derartige Überlebens-tests sind selten beschrieben worden und es schien uns notwendig, einige Versuche in dieser Richtung zu unternehmen. Unsere Versuchsanstellungen bauten auf den Ergebnissen der Arbeiten von Irmischer (1913) und Walter (1923 und unveröffentlichten Beobachtungen) auf. Irmischer schilderte die unterschiedlichen Wirkungen verschiedener Plasmolytika auf Moosprotonemen und Walter beobachtete, daß *Elodea*-Sprosse stets wenige Tage nach einer Plasmolysierung abstarben.

In anderer Hinsicht können Untersuchungen über das Verhalten eines Gewebes nach einem so intensiven Eingriff, wie es eine Plasmolyse darstellt, einen Beitrag zur Kenntnis der Entwicklungsfähigkeit einzelner Zellen oder Zellverbände leisten. Namentlich bei Moosen, die wir uns als erste Versuchsobjekte gewählt hatten, sind derartige Studien interessant und häufig durchgeführt worden (z. B. Kreh 1909, Stange 1957, Sironval 1947 und Bopp 1954 und 1955, hier und bei Müller 1906 und 1951 weitere Literatur).

Wir haben Moose deshalb als erste Versuchsobjekte ausgewählt, weil wir

an diesen eventuell auftretende methodische Schwierigkeiten am leichtesten zu lösen hofften und für weitere Versuche Erfahrung sammeln wollten. Die Versuche wurden im Botanischen Institut Stuttgart-Hohenheim durchgeführt. Herrn Prof. Walter danken wir für die Anregung zu dieser Arbeit und sein stetes Interesse.

Material und Methode

Als Versuchsobjekte verwendeten wir *Lophocolea bidentata* (L.) Dum., die wir in ausreichendem Maße im Botanischen Garten fanden, und

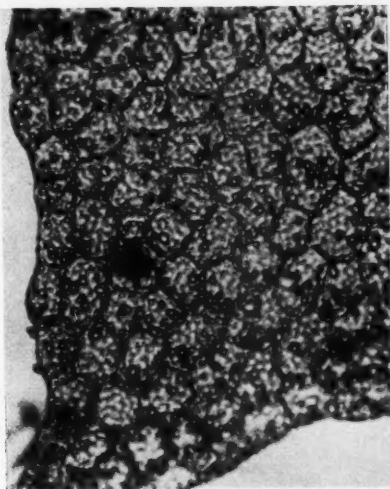


Abb. 1.

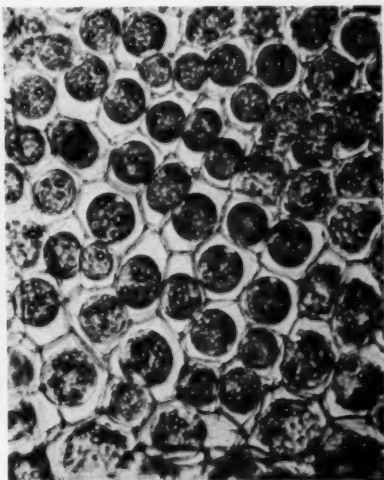


Abb. 2.

Abb. 1. Blattzellen in der Kontrolle.

Abb. 2. Plasmolyse in 1 mol KCl.

für einige zusätzliche Versuche *Lophocolea heterophylla* (Schrad.) Dum., die uns Herr Prof. Irmscher aus der Schwäbischen Alb mitbrachte. Aus dem frisch gesammelten Material haben wir geeignete Sproßstückchen ausgesucht, diese gut abgewaschen und anschließend zur Plasmolysierung in die Lösungen eingelegt.

Als Plasmolytika verwendeten wir 1- und 2-mol Rohrzucker-, 1 mol KCl-, 1 mol KNO_3 -, und 1 mol KSCN-Lösungen. Die ausgesuchten Sprosse wurden ganz in diese Lösungen eingetaucht und die fortschreitende Plasmolyse mikroskopisch kontrolliert. Nach 10 min waren alle Blattzellen in allen Lösungen plasmolysiert (Abb. 2), mit Ausnahme der 1 mol Zuckerlösung, bei der auch dann noch einige Zellen nicht plasmolysiert waren. In dieser blieben die Moosstückchen 20 min. Danach waren auch hier alle Zellen plasmolysiert. Nach abgeschlossener Plasmolyse wurden die Sprosse

gut abgewaschen und so lange in aqua dest. belassen, bis wir unter dem Mikroskop wieder die vollständige Deplasmolysierung feststellen konnten. Die ganze Prozedur war in einer halben Stunde abgeschlossen. Wie wir später bei den Rhodanid-behandelten Pflanzen feststellen konnten, blieben nur die von vielen jungen Blättchen umgebenen Sproßspitzen unbeeinflusst.

Kultiviert wurden die Moosstückchen anschließend an diese Behandlung in Petrischalen auf Knopagar in der Vorschrift nach Lieth 1956. Um ein Verpilzen der Kulturen zu verhindern, haben wir die geöffneten Schalen in einem sterilen Raum mit Phytox besprüht. In den so behandelten Schalen entwickelten sich neben den Moosen nur noch einige Algen, die aber die Versuche nicht störten.

Die Hauptversuche wurden im April und Mai 1958 durchgeführt. Die Kulturschalen standen an einem Nordfenster; die Raumtemperatur lag bei 16°—20° C.

Ergebnisse

Den Entwicklungsstand der Kulturen haben wir täglich kontrolliert. Bei *Lophocolea bidentata* ließ sich nach 6 Tagen bereits die Wirkung der einzelnen Plasmolytika erkennen.

In KSCN behandelte Pflanzen zeigten nur noch lebende Sproßspitzen. Alle anderen Zellen waren ausgebleicht.

Die mit 2 mol Rohrzucker und die mit KCl und KNO₃ behandelten Sprosse entwickelten sich eigenartig. Ein hoher Prozentsatz der Blattzellen begann sich zu teilen. Jede der sich teilenden Zellen bildete eine der schon von Kreh bei Regenerationskulturen beschriebenen Brutknospen. *L. bidentata* kann solche Brutknospen am Blattrand auch unter natürlichen Bedingungen ausbilden, hier aber entwickelte sich bei manchen Blättern jede zweite bis vierte Zelle in eine solche. Die beigegebenen Abbildungen 3 und 4 zeigen die Entwicklung der Brutknospen 12 Tage nach der Plasmolysenbehandlung. Abb. 1 bringt zum Vergleich das Aussehen der bis auf die Plasmolyse gleich behandelten Kontrollen.

In der weiteren Entwicklung unterschieden sich die Kulturen aus den einzelnen Lösungen. Innerhalb eines Monats entwickelten sich bei den mit KCl und KNO₃ behandelten Pflanzen sehr viele der Brutknospen zu kleinen Pflänzchen, und zwar bei KCl mehr als bei KNO₃. In der 2-molaren Zuckerlösung blieben die Brutknospen dagegen auf einem 8—50-Zellenstadium und die weitere sehr gute Entwicklung der Sprosse fand an der Spitze und aus neu entstandenen blattachselständigen Seitensprossen statt.

Die mit 1 mol. Rohrzucker behandelten Pflanzen bildeten nur ganz wenige Brutknospen am Rande der Blätter aus. Diese entwickelten sich ebenfalls nicht weiter und nach einem Monat war zwischen diesen und den Kontrollen kein wesentlicher Unterschied mehr festzustellen.

Mit *L. heterophylla* konnten wir nur wenige Versuchsreihen anstellen. Die Behandlung war ebenso wie bei *L. bidentata*. Bei diesen Kulturen konnten wir an einigen Blättern der in KCl behandelten Pflanzen die ebenfalls bei Hofmeister beschriebenen peitschenartigen Auswüchse einiger Zel-

len beobachten. Diese entwickelten sich innerhalb eines Monats jedoch nicht weiter und wir haben wegen der Seltenheit der Erscheinung diese nicht weiter verfolgt.

Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

1. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Irmischer fanden wir Zuckerlösung als schonendstes Plasmolytikum. 1 mol. Rohrzuckerlösung hat nahezu keinen Einfluß auf die weitere Entwicklung der behandelten Sprosse gegenüber der Kontrolle gehabt. Ein Zellgift wie KSCN dagegen tötet während der Behandlung die Zellen ab.

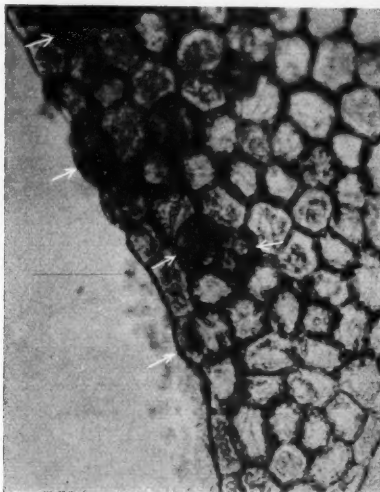


Abb. 3.

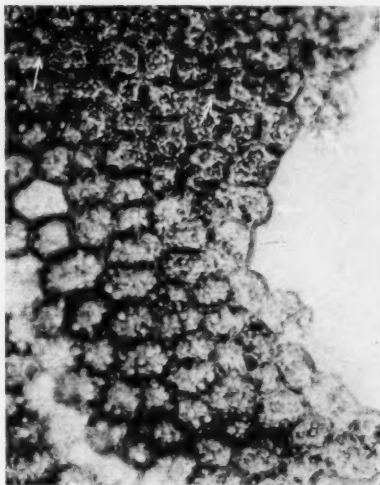


Abb. 4.

Abb. 3. 12 Tage nach Deplasmolyse in 2 mol Rohrzucker. ↑ Brutknospeninitialen

Abb. 4. 12 Tage nach Deplasmolyse in 1 mol KCl. ↑ Brutknospeninitialen

2. Die plasmolytische Behandlung, vor allem mit Lösungen von 1 mol KCl und KNO_3 zerstören offenbar den Zusammenhang im Blattgefüge. Sehr viele Zellen, über das ganze Blatt zerstreut, bilden Regenerationsformen aus, wie man sie bei der Kultur kleiner Blattsegmente erhält. Bei einschichtigen Gebilden, wie es diese Moosblättchen darstellen, dürfte daher die Anwendung der Plasmolyse bei Entwicklungs- und Regenerationsstudien unter Umständen vorteilhaft sein.

Literatur

- Bopp, M., 1954: Ein Beitrag zur Differenzierung im Moosprotonema. Ber. dtsh. bot. Ges. 67, 176—185.
— 1955: Die Entwicklung von Zelle und Kern im Protonema von *Funaria hygrometrica* Sibth. Planta 45, 573—590.

- Höfler, K., und W. Url, 1957: Kann man osmotische Werte plasmolytisch bestimmen? Ber. dtsh. bot. Ges. 70, 462—476.
- Irmscher, A., 1915: Über die Resistenz der Laubmoose gegen Austrocknung und Kälte. Jb. wiss. Bot. 50, 387—449.
- Kreh, W.: Über die Regeneration der Lebermoose. Halle 1909.
- Lieth, H., 1956: Die Wirkung des Grünlichtes auf die Fruchtkörperbildung bei *Didymium eunigripes*. Arch. Mikrobiol. 24, 91—104.
- Müller, K.: Die Lebermoose in Rabenhorsts Kryptogamenflora, II. Auflage, 1906—1911, III. Auflage, 1951—1956.
- Sironval, C., 1947: Experiences sur les stades de développement de la forme filamenteux en culture de *Funaria hygrometrica*, Bull. Soc. Roy. Bot. Belg. 79, 48.
- Stange, L., 1957: Untersuchungen über Umstimmungs- und Differenzierungsvorgänge in regenerierenden Zellen des Lebermooses *Riella*, Z. Bot. 45, 197—262.
- Walter, H., 1925: Protoplasma- und Membranquellung bei Plasmolyse. Jb. wiss. Bot. 62, 145—215.

Crown gall an viruskranken Pflanzen

Von

Helga Kelbitsch

Aus dem Institut für Anatomie und Physiologie der Pflanzen der Universität Graz

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 6. Mai 1960)

In der Literatur liegen nur spärliche Angaben vor, ob sich im crown gall-Gewebe Viren entwickeln können. Gautheret (1959, 180) führt kurz eine persönliche Mitteilung von Hirth und Segretain an, denen es gelungen sei, crown gall-Tumoren an *Nicotiana* zu erzielen, die das Tabakmosaikvirus enthielten. Sie entnahmen einer Gewebekultur von Tabak-Kronengallen-Tumor ein Fragment und transplantierten es in die Sprosse junger Tabakpflanzen; gleichzeitig wurden die Pflanzen mit dem Mosaikvirus durch Einreiben in der üblichen Weise infiziert. Die Pfropfung ergab voluminöse Tumoren. Das Vorhandensein des Virus in den Tumoren wurde durch die Methode der Auslösung von Lokalläsionen an *Nicotiana glutinosa* bewiesen. Diese Versuche zeigen, daß das Virus auf das Tumorgewebe übergehen und sich in ihm vermehren kann.

Unabhängig davon hat sich im Laufe meiner Untersuchungen an crown gall (Kelbitsch 1960) die Frage ergeben, ob sich Viruseinschlußkörper in Krongallen entwickeln können. Es wurde dabei von bereits viruskranken Pflanzen ausgegangen und an diesen erst durch Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* die Krongallbildung ausgelöst. Versuchspflanzen waren einerseits *Schlumbergera truncata* (*Epiphyllum*) und andererseits *Hesperis candida*.

I. Versuche mit *Schlumbergera truncata*

Schlumbergera truncata ist häufig Virusträger, und zwar wird es von dem *Epiphyllum*-Mosaik-Virus befallen (Klinkowski 1958). Die äußeren Krankheitssymptome sind oft recht gering; sie bestehen im Auftreten weißlicher oder gelber Flecken an den Kladodien, die einsinken und nekrotisch werden können. Aber auch dort, wo diese Symptome fast ganz fehlen, läßt sich die Virose mikroskopisch eindeutig feststellen. In viruskranken *Schlumbergera-truncata*-Pflanzen — und nur in diesen — treten

nämlich in den Epidermiszellen der Flachspresse regelmäßig Eiweißspindeln auf, die als erster Molisch (1885) beschrieben hat. Rosenzopf (1951) wies nach, daß diese Spindeln Viruskristalle sind. Zunächst mußte der Ver-

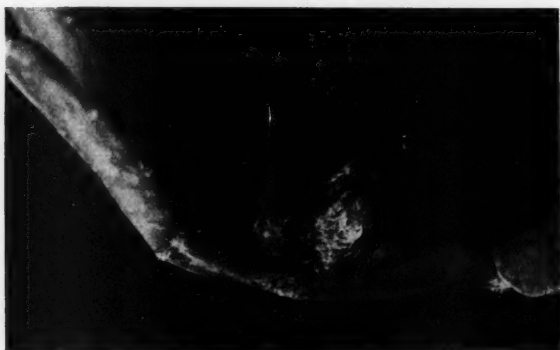


Abb. 1. *Schlumbergera truncata*. Tumor 17 Monate nach der Infektion mit A. t.

such, an *Schlumbergera* durch Infektion mit *Agrobacterium* Tumoren zu erzeugen, recht aussichtslos erscheinen. Riker, Spoerl und Gutsche (1946) konnten nämlich an Pflanzen mit saurem Zellsaft keine Krongallen

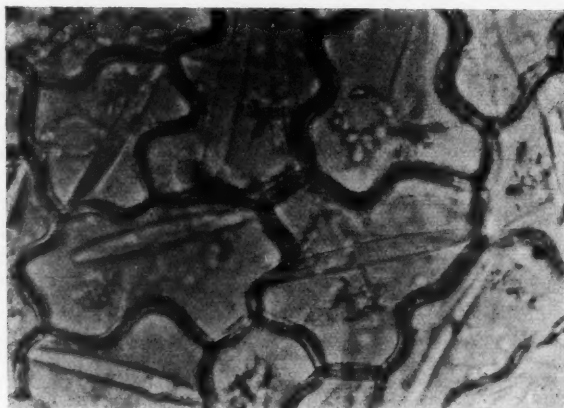


Abb. 2. *Schlumbergera truncata*. Epidermiszellen mit Viruseinschlüssen (Eiweißspindeln und Stachelkugeln).

erzielen und auch Tamm (1954) ist es nicht gelungen, bei Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* an Kakteen Tumoren zu erhalten.

In meinen Versuchen bildeten sich nach Impfung mit *Agrobacterium tumefaciens* sowohl an virusfreien als auch an viruskranken Pflanzen, und zwar an allen der 40 Exemplare, Krebsgeschwülste. Die Induktion von

crown gall gelingt also, obwohl der Preßsaft von *Schlumbergera*-Kladodien einen pH-Wert von 5,9 besitzt. Auffallend an der Tumorbildung an *Schlumbergera* war das sehr langsame Wachstum und die verhältnismäßig gute histologische Differenzierung der Geschwülste. Der umfangreichste Krebs an *Schlumbergera* erreichte nach 17 Monate langem Wachstum eine Höhe und Breite von 1 cm und eine Länge von 1,4 cm (Abb. 1). Die meisten Tumoren wuchsen in dieser langen Zeit höchstens bis zu Erbsengröße heran. Die Infektion mit dem Bakterium erfolgte an den Kladodien stets an der „Oberseite“, dort bildeten sich auch die Tumoren, nur einmal entstand auch an der „Unterseite“ ein Tumor mit glatter Oberfläche ohne histologische Differenzierung; ich halte ihn für einen Sekundärtumor.

Nachdem es also gelungen war, an viröser *Schlumbergera* durch *Agrobacterium*-Infektion Krongallen zu erzeugen, war festzustellen, ob das Virus aus der Trägerpflanze in die Geschwulst übergegangen ist. Die mikroskopischen Untersuchungen ergaben, daß in der Epidermis und Subepidermis aber

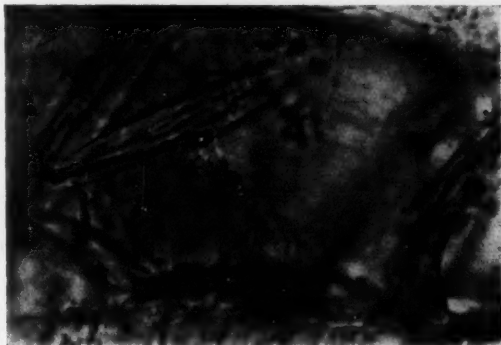


Abb. 3. *Schlumbergera truncata*. Tumorgewebe mit in Fibrillen zerfallener Eiweißspindel und Stachelkugeln.

auch im übrigen Tumorgewebe die kristallinen Viruseinschlüsse in großer Menge vorkamen. Es waren nicht nur Eiweißspindeln, sondern auch die bei *Schlumbergera* seltener vorkommenden sogenannten „Stachelkugeln“ (Milićić und Plavšić 1955) vorhanden (Abb. 2).

Die Spindeln im Tumorgewebe unterschieden sich von denen in der Trägerpflanze darin, daß sie meist lockerer gebaut waren und leichter in Fibrillen zerfielen (Abb. 3), nicht erst nach Behandlung mit quellend wirkenden Substanzen (Amelunxen 1955) oder mit Alkohol (Reiter 1956).

Der Nachweis des Vorhandenseins der Viren im Tumorgewebe wurde auch noch in folgender Weise erbracht:

Eine crown gall-Geschwulst, die Eiweißspindeln und Stachelkugeln enthielt, wurde zerrieben und virusfreie *Schlumbergera* mit dem Gewebepulver infiziert. Nach drei Wochen traten in den Kladodien Eiweißspindeln und Stachelkugeln auf, das mikroskopische Symptom der Viruserkrankung.

Es darf angenommen werden, daß sich die virushaltigen *Schlumbergera*-Tumoren in vitro kultivieren lassen (Gautheret 1959). Es ergäbe sich dann die Möglichkeit, das Kakteen-Virus in Gewebekultur zu züchten, wie dies mit anderen Viren schon gelungen ist.

II. Versuche mit *Hesperis candida*

Im Botanischen Garten der Universität Graz kamen im Frühsommer 1959 neben gesunden Pflanzen von *Hesperis candida* auch Exemplare vor, die auffallende Merkmale einer Mosaikkrankheit zeigten.

Reiter und Weber (1959) haben über diese Virose berichtet und vermuten, daß der Erreger dasselbe Virus ist, das von Miličić, Panjan, Bilanović und Katić (1958) als „*Alliaria-Virus*“ bezeichnet wurde. Aus Samen gesunder *Hesperis candida*-Pflanzen gezogene Keimlinge (40 Stück) wurden durch Einreiben mit dem Preßsaft kranker Pflanzen infiziert. Nach zwei Monaten traten an allen infizierten Pflanzen die von Reiter und

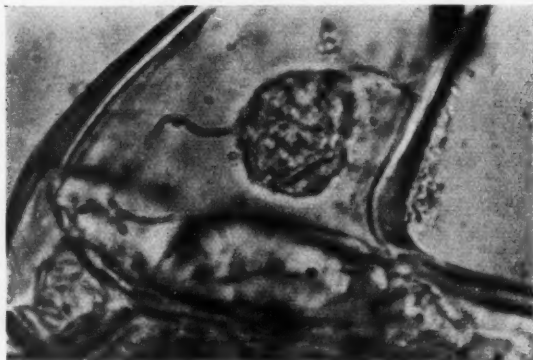


Abb. 4. *Hesperis candida*. Haar mit x-body, der einen länglichen Eiweißkristall umschließt.

Weber (1959) beschriebenen makro- und mikroskopischen Krankheits-symptome auf: gelblichweiße Flecke an den Blättern, Wachstumshe-mmung und Deformierung, besonders in den Trichomen protoplasmatische x-Körper und in den älteren x-bodies Viruskristalle verschiedener Form (Abb. 4).

Gesunde und viruskranke Jungpflanzen wurden am Hypokotyl mit *Agrobacterium tumefaciens* infiziert. An beiden bildeten sich gleich große Tumoren, die nach zwei Monaten durchschnittlich einen Durchmesser von 1,5 bis 2 cm erreichten (Abb. 5). Im anatomischen Bau und in der Größe unterschieden sich die Tumoren an den virusfreien Pflanzen nicht von denen an den viruskranken. Aber in der Epidermis und im ganzen Tumorgewebe der viruskranken Pflanzen waren x-Körper, die sehr groß und stark vakuolisiert waren (Abb. 6). Manchmal traten auch Kristallplättchen innerhalb oder außerhalb der x-Körper auf.

Schon durch die Bildung der protoplasmatischen und kristallinen Virus-einschlußkörper in den Tumorzellen war der Beweis dafür gegeben, daß das Virus aus der Trägerpflanze in den Tumor übergegangen und dort vermehrt worden ist. Ein weiterer Beweis dafür wurde in folgender Weise erbracht:

Aus viruskranken Tumoren wurde ein Gewebebrei bereitet und damit 25 junge gesunde Keimpflanzen infiziert. Schon nach 18 Tagen traten in den



Abb. 5. *Hesperis candida*. Tumor zwei Monate nach der Infektion mit A. t.

etwa 10 cm hohen Pflanzen x-bodies auf (Abb. 7), und zwar sowohl in den Trichomen als auch in der Epidermis der Blattmittlerippe. Die jungen Blätter wiesen bereits die für die Virose charakteristischen, oben beschriebenen äußerlichen Krankheitszeichen auf.



Abb. 6.

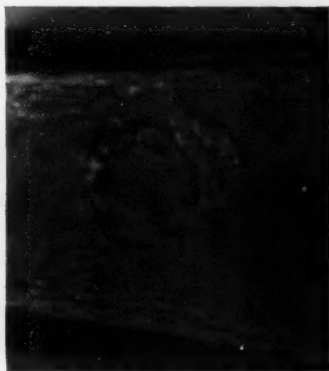


Abb. 7.

Abb. 6. *Hesperis candida*. Tumorgewebe mit am Kern angelagertem x-body.

Abb. 7. *Hesperis candida*. Haar einer durch viröses Tumorgewebe infizierten jungen Pflanze mit x-body neben dem Kern.

Schlußbemerkung

Die Versuche mit *Schlumbergera* und mit *Hesperis* haben also zu dem gleichen Ergebnis geführt: Werden viruskranke Pflanzen durch Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens* zur Tumorbildung veranlaßt, so treten in den Geschwulstzellen ebenfalls Viruseinschlußkörper auf; durch Gewebekreislauf aus den Tumoren läßt sich das Virus auf gesunde Pflanzen übertragen.

Bei der Umwandlung von normalen Körperzellen in Tumorzellen durch das tumorerzeugende Prinzip des *Agrobacterium tumefaciens* geht, wie sich aus zahlreichen Arbeiten ergab (Braun und Stonier 1958), eine Änderung des Stoffwechsels vor sich: Die Krebszellen bilden im Gegensatz zu den normalen Zellen viel mehr Wuchsstoff. Diese Stoffwechselumstellung verhindert nun offenbar die Virusbildung nicht. Es wird weiter zu prüfen sein, ob der Gehalt an Viren im Tumorgewebe größer oder kleiner ist als im normalen. Bei dem relativ schnell wachsenden Tumor von *Hesperis* wäre es wohl möglich, daß bei den rasch aufeinanderfolgenden Zellteilungen eine „Verdünnung“ des Virusgehaltes eintritt. Es könnte sich dann in den Tumoren eine Befreiung von den Viren mit der Zeit einstellen.

Braun und Stonier (1958) nehmen bei Erörterung der Virus-Theorie der Kronengallen-Entstehung an, daß etwas derartiges bei rasch sich entwickelnden pflanzlichen Teratomen zu einer Ausheilung führen kann. Sie erreichten nämlich durch oftmaliges Aufpfropfen mißgebildeter *Nicotiana tabacum*-Teratoma-Sprosse auf gesunde Pflanzen nach und nach eine völlige Normalisierung des Gewebes. Die Vertreter der Virus-Theorie der crown gall sind ja der Ansicht, daß das tumorinduzierende Prinzip des *Agrobacterium* ein Virus ist. Wenn dies zutreffen sollte, dann läge bei den Kronengallen an viruskranken Pflanzen der Fall vor, daß sich zwei verschiedene Viren in einer Zelle entwickeln.

Virus-Mischinfektionen sind auch sonst schon bekannt.

Zusammenfassung

Es wurden viruskranke Pflanzen von *Schlumbergera truncata* und von *Hesperis candida* mit *Agrobacterium tumefaciens* infiziert. In den daraufhin entstandenen Tumoren ließ sich das Vorkommen des Virus dadurch nachweisen, daß in den Tumorzellen Viruseinschlußkörper vorkommen und daß sich durch Infektion mit Tumorpresse-saft dieselben Viren hervorrufen lassen. In Tumorzellen entwickelt sich demnach das Virus in gleicher Weise wie in den nicht tumorigen Zellen.

Dem Vorstand des Instituts für Anatomie und Physiologie der Pflanzen, Herrn Professor Dr. Otto Härtel, danke ich für die Überlassung des Themas, Frau Dozent Dr. Irmtraud Thaler bin ich für die ständige wertvolle Förderung meiner Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Literatur

- Amelunxen, F., 1955: Beobachtungen über die Entwicklung der Eiweißspindeln bei Cacteen. *Protoplasma* 45, 164.
 Braun, A. C., and T. Stonier, 1958: Morphology and Physiology of Plant Tumors. *Protoplasmatologia* 10, 1.

- Gautheret, R. J., 1959: La culture des tissus végétaux. Paris.
- Kelbitsch, H., 1960: *Cuscuta* als Überträger des Crown gall erzeugenden Prinzip. Protoplasma 52, 457.
- Klinkowski, M., 1958: Pflanzliche Virologie. Berlin.
- Miličić, D., und B. Plavšić, 1955: Eiweißkristalloide in Kakteen-Virusträgern. Protoplasma 46, 547.
- M. Panjan, D. Bilanović, und B. Katić, 1958: Viruserkrankheiten von *Alliaria officinalis*. Acta Botanica Croatica 17, 159.
- Molisch, H., 1885: Über merkwürdig geformte Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. Ber. dtsh. bot. Ges. 3, 195.
- Reiter, L., 1956: Studien über Viruseinschlusskörper und Eiweißkristalle in Pflanzenzellen. Diss. Graz.
- und F. Weber, 1959: Einschlusskörper in viruskranken *Hesperis*-Zellen. Protoplasma 51, 632.
- Riker, A. J., E. Spoerl, and E. Gutsche, 1946: Some comparisons of bacterial plant galls and of their causal agents. Bot. Rev. 12, 57.
- Rosenzopf, E., 1951: Sind Eiweißspindeln Virus-Einschlusskörper? Phyton 3, 95.
- Tamm, B., 1954: Experimentelle Untersuchungen über die Verbreitung des bakteriellen Pflanzenkrebses und das Auftreten von Sekundärtumoren. Arch. Mikrobiol. 20, 273.

Nicotine as a Redox-reducing Reagent Producing Abnormal Growth in Animal Cells

By

Matilda Moldenhauer Brooks

Department of Physiology, University of California, Berkeley California

With 3 Textfigures

(Received May 12, 1960)

It has been found by different investigators that certain reagents, when added to sea water in which sea urchins were developing produced an abnormal-shaped larva, called "exogastrula." Instead of forming the normal triangular shape of pluteus, these embryos remained rounded in the blastula state with the gut extended outwards instead of inwards. The classical shape of the exogastrula, as found by Herbst (1896) with lithium chloride consists of 1 to 3 circular parts which comprise the extruded gut, extending outwards from the basal region of the larva. There are also variations of this in different forms, such as an ovate shape with an aggregation of dissociated cells in clusters either inside the basal region or extending outwards into a protrusion; or streamers of cells growing outwards from the basal end of the larva; or cells growing outwards from the upper end of the gut if this has already formed inside the larva. There are also some cases in which the round blastula is filled with a mass of dissociated cells which remain until disintegration. Many of these forms have been illustrated by Child (1948). This subject has been discussed by Brooks (1959, 1960) who showed that these reagents could all be classified under the heading of "reducing reagents" whereby the oxidation-reduction potential of the sea water became more negative, due to the inhibition of one of the redox enzymes which control the activation of oxygen and the consequent release of energy for metabolism. It was shown that these reagents in their final result, produced similar effects on the growth processes, even though they differed in their chemical constitution, because each one inhibited one of the steps in the redox cycle, though not necessarily the same step. By interfering with any one of the steps of the oxidation-reduction cycle,

by which oxygen is activated for normal aerobic growth, the entire redox potential of the system is lowered to a more negative value. It was therefore concluded that the redox potential is the limiting factor for the development of cells to produce a normal pattern of growth.

In the case of sea urchins, the inhibition by these reagents of normal oxygen activation first became evident in the beginning of the gastrula stage where the mesenchyme cells normally form and where the gut invaginates. Child (1953) showed that the basal end (endoderm) of the larva has a more negative redox potential than the apical end (ectoderm). By subjecting these larvae to a negative potential the endoderm develops at the expense of the ectoderm. He also showed that the formation of mesenchyme cells depends upon the appearance of a more positive redox potential at a certain stage of development in a definite area of the blastula. If this potential is prevented from occurring, the mesenchyme cells do not appear, and the gut grows outwards, forming the exogastrula.

The highest energy level in cell growth is in the region where molecular oxygen is directly activated by the cytochrome oxidase system. Oxygen is the vital force which must be activated by the various catalysts before it produces energy, since it is inert in the molecular state. For this reason, the appropriate enzyme activity is the controlling force for growth of cells.

As the cell develops various catalysts are produced which activate definite chemical reactions. The process of growth of cells is not static but constantly changing through the formation of different biochemical substances. One step of this process is contingent upon the preceding one for the proper redox potential necessary for the changes which constantly take place in relatively infinitesimal values in most cases. If therefore the next step in the normal growth process is inhibited the following one cannot occur and the cell remains in a primitive state, or disintegrates at a lower energy level. When therefore, an abnormal substance is added to the environment, in which the cell is developing, the electrical forces are disoriented, the energy level is reduced and growth of the cell becomes abnormal. This analysis is the basis of the conclusions stated by Brooks (l. c.) to indicate what occurs when cells are subjected to reagents which interfere with the appropriate oxygen activation and the consequent reduction in energy level.

One of these reagents which produces this effect on sea urchin larvae is tobacco smoke as found by Child (1948) in the experiments on *Strongylocentrotus purpuratus*. He found that a few puffs of tobacco smoke produced exogastrula in sea urchin larvae. In these experiments, however, there was no differentiation as to what part of the smoke which included other factors besides nicotine, was responsible for the effect.

The great emphasis placed on filters in the case of cigarettes, has the implication that the wrappings, or coal tar products of the other ingredients in the manufacture of cigarettes or the sprays used on tobacco leaves produce the injurious effects of smoking and that the partial elimination of these would result in safety from harm. It was therefore thought of interest

to differentiate between these factors by using solutions of nicotine alone and note its effects on the development of sea urchin larvae. The following results give the answer.

Method

The eggs and larvae of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, found on the west coast of California were used. They were placed for development in solutions of nicotine dissolved in sea water in concentrations varying from .0001% to .000002% at different stages of growth for varying periods of time before being transferred back to sea water alone. The temperature was kept constant at 15° to 16° C. in a water bath. Nicotine was obtained in solution from the Eastman Kodak Co. with the formula of $\text{CH} : \text{NCH} : \text{CCH} (\text{CH}_2)_3 \text{NCH}_3$. The larvae were placed in the experimental solution at the two to four-cell stage or the blastula as these stages appeared to be more sensitive to changes in environment.

Results

Figure 1 *A* shows a normal pluteus of *Strongylocentrotus purpuratus* which is the usual triangular shaped larva. Figure 1 *B* is that of an exogastrula, obtained by placing larvae in the 2-cell to 4-cell stage into solutions of nicotine in sea water. The concentrations were .000002% or .000003%. The larvae remained in these solutions for 24 hours before being replaced into sea water. The solution of nicotine was colorless. Under these conditions about 95% became exogastrula.

In concentrations of .00005% a few larvae developed as far as the morula stage, became dark in color and ceased to grow. In solutions of .0001% no growth occurred. When larvae were placed as blastula in solutions of nicotine at a concentration of .00001%, they remained round and swimming and became completely filled with dissociated cells and without producing spines. If removed from the reagent after 48 hours into sea water alone, they remained round with a thickened basal growth which extended outwards in many cases into an ovate shape. In other cases, the basal end became filled with dissociated cells. After some time swimming ceased, and a gradual decrease in size occurred until disintegration set in. Figure 2 illustrates one of these figures, slightly enlarged, with the basal end extending outwards.

The nicotine remains colorless in a dark, stoppered bottle, but after being opened several times, it assumes a slight brownish tinge, and requires a more concentrated solution for producing exogastrula. Under these conditions, in addition to the classical shapes previously described, shapes similar in form as illustrated in Fig. 3 were produced in about 70%. The blastula became dark in color and filled with dissociated cells. They remained round and swimming but without spines. At the basal end a thin thread extended outwards as shown in Fig. 3 *A*, from which a mass of dissociated cells grew into a relatively large sheet of cells which finally broke off in large masses as shown in Fig. 3 *B*. At this time the blastula

which was still swimming became darker in color and smaller, remaining in this shape without cytolysing until swimming ceased. In a few cases the gut was formed but remained lying across the basal end, from which a stream of cells grew outwards from either end of the gut into sea water. The concentration of nicotine in this case was .00002 %

In more concentrated solutions of either the colorless or the slightly brownish tinged solution of nicotine, the larve did not divide beyond the 16-cell stage put became dark and disintegrated.

One can infer from the results in Fig. 3 which required a more concentrated solution, that the nicotine must have been in a more oxidized state, thereby raising its potential to a slightly more positive level than that of the fresh, colorless form. However, the results indicate that the potential was still within the negative region for the production of such abnormal larvae.

These experiments show that nicotine solutions are also reducing reagents interfering with the normal redox potentials necessary for normal growth. Further corroboration for the interpretation of these results can be found in the experiments of Brooks (1954, 1956) in which redox dyes producing a negative potential were used as compared with those

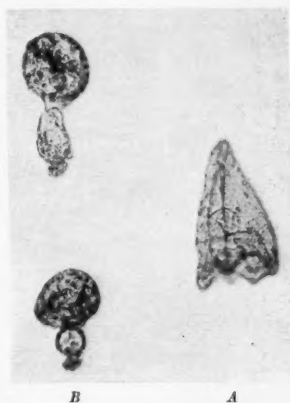


Fig. 1. Larvae of *Strongylocentrotus purpuratus*. A, normal pluteus, control. B, exogastrula produced in concentrations of .000002% or .000003% of nicotine solution in sea water.

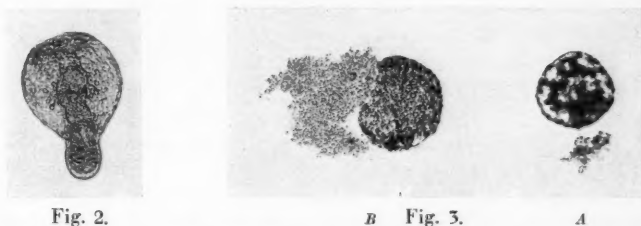


Fig. 2.

B Fig. 3.

A

Fig. 2. Larva of *Strongylocentrotus purpuratus*. After 48 hours in .00001% of nicotine in sea water. Slightly enlarged.

Fig. 3. Larva of *Strongylocentrotus purpuratus*. A, after 24 hours in tinged nicotine solutions of .00002% in sea water. Showing exit of cells. B, showing masses of cells at a later stage.

giving a positive potential. In the former case larvae were formed which were similar in shape to those discussed under the category of reducing reagents, namely without spine formation and as exogastrula.

The shapes produced in Fig. 3 are a striking example of undifferentiated growth of cells which resemble the method of growth of cancer cells as found in other forms of living tissues.

Discussion

In living cells the basis of energy production is finally dependent upon the rate of activation of oxygen at the positive level of the metabolic scale. All matter is electrical and a constant electron exchange takes place in every minute portion of the living cell by virtue of which energy for the life processes is produced. Energy is expressed as oxidation states on the oxidation-reduction scale in terms of EMF or volts, in which the ratio of oxidants to reductants in equivalent concentrations at a definite pH value is the electrode potential, namely, E_0 . Minute differences in electrode potential produce definite effects in the biochemical combinations which form as growth proceeds, and which change at different stages of development. Brooks (1946) has illustrated this change in a general way in the case of sea urchin development.

In living tissue, the range of the EMF concerned is limited to a very small portion of the over-all energy levels and small deviations from the normal have significant effects on growth. Such a limitation can be compared to the area of light waves of the spectrum which the human eye is capable of discerning, i. e., from 400 to 800 $m\mu$. The energy levels for normal metabolism of aerobic cells lie between the region of activation of oxygen and that of hydrogen and normally around neutrality at pH 7.0 at .011 volt. Deviation in either direction may occur without injury if slight. Barron (1929) has shown this in his experiments on sea urchin eggs in which he used redox indicators and measured their effects on the rate of oxygen consumption. He found that methylene blue gave a slight increase in rate, but that those indicators producing a more positive or a more negative redox potential retarded the rate. Methylene blue has an E_0 of .011 volt at pH 0.7. These experiments show definitely the effect of changes in redox-potential as affecting oxygen activation.

It may be objected that the cells of sea urchins are far removed in the evolutionary scale from those of the higher animals and man, and that what applies to them does not necessarily apply to those in the higher groups of animal life. However, in experiments on rats and mice with transplanted tumours, Brooks (1934) showed that injections of methylene blue produced a large percentage of regressions as compared with spontaneous regressions. Since tumours grow at a reduced energy level, the theory was applied whereby the redox potential was changed by this method to a more positive level.

The complexity of organization of the tissues of the higher animals and man as compared with that of the low forms of animal life, such as sea urchins, appears to be rather remote at first sight. There are however certain factors which operate in the case of protoplasm in general and its reactions to certain reagents.

In animals living in an aerobic environment, the one factor which is common to all such forms, whether in the higher or the lower category of evolution is the necessity for oxygen. Oxygen, *per se*, is relatively inactive in the molecular state and needs to be activated. This process requires successive steps in the redox scale as the various enzymes react and maintain the correct ratio of oxidants to reductants whereby the necessary energy is produced at the final step for the activation of oxygen. The limiting factor for this process is the redox potential. Any inhibition or elimination of one of these steps in the scale will change the redox potential and the ratio of oxidants to reductants all along the line. If therefore, a reducing reagent is used, the reductants will become more concentrated, the redox potential will become more negative, less oxygen can be activated, the energy level will be lowered and abnormal growth will result.

In previous publications Brooks (l.c.) has discussed this inhibition of enzyme activity which may occur at any region of the redox scale as the cause of the production of "exogastrulation" by a variety of reagents.

The similarity of protoplasm in living animals in general and its reaction to certain reagents which reduce aerobic respiration is exemplified by the effects of cyanide, which produce a negative potential. Sea urchin eggs in the unfertilized state are not affected adversely by it since their potential is also negative. In fact, it has been shown by others that their life span can be prolonged because of the low rate of oxygen consumption at this stage. However as soon as the egg becomes fertilized, the rate of oxygen consumption rises and at this stage cyanide inhibits respiration. Brooks (1946) has discussed this effect of cyanide as due to a change in the ratio of oxidants to reductants whereby the potential of the egg becomes positive on fertilization and is therefore affected by the negative potential produced by cyanide, so that respiration is inhibited.

Another comparison of the effects of cyanide in higher animals and man is well known. Respiration is inhibited and death results. In certain experiments on rats and mice Brooks (1932) used various redox indicators and showed that injections of methylene blue produced recovery from cyanide. Here again the potential was changed back to the positive level with subsequent survival of the animals.

Child (1953) has also noted that a change in redox potential occurs at a certain stage of growth of the sea urchin. He found that a definite area of the blastula stage, at the time of development of the mesenchyme cells and invagination of the gastrula, oxidized certain indicators in contrast to the rate of oxidation of similar indicators in the endodermal regions. This showed that these regions had a more positive potential. However, when the larvae were subjected to certain potentials no mesenchyme cells were formed, no spines produced and no invagination of the gut occurred and the exogastrula produced.

Since nicotine also gives similar results as those produced by cyanide and other reducing reagents on sea urchin larvae, nicotine has also been classified as a reducing reagent (Brooks 1960).

In the studies on the effects of nicotine upon the various tissues and organs of the higher forms of animal life, certain comparable results occur which are subject to a similar explanation as that given in these studies. The complexity of structure in the higher animals and man makes it more difficult to compare results with those found in the lower forms. However, the basic causes are identical as affecting protoplasm and the specific effects are the results of the fundamental cause underlying the changes.

There have been many experiments to show the effect on different tissues and organs in higher animals caused by nicotine. Such changes include vaso-constriction of the arterioles as a result of nicotine on the nerve endings. The blood supply to the tissues is reduced and an extra load is put on the heart muscles to compensate for the reduced bore of the blood vessels (see Ochsner 1954). Nicotine also reacts on the adrenal glands which release adrenalin which in turn causes the liver to release more sugar into the blood stream. This incidentally, is the cause of the "lift" which is momentarily obtained by smoking, resulting in a feeling of well being, but followed by a depression after the sugar is utilized, so that repeated use of the nicotine must be maintained to produce similar effects.

In all these cases the primary cause of these effects is the lowering of the oxidation state to a negative potential, reducing the energy level so that an abnormal state of growth results. Only those cells which can grow are embryonic. This change in structure is readily seen in the sea urchin larva, but in the higher forms of animal life, specific changes in the complex structures and the biochemical reactions are more in evidence than the real cause at the fundamental basis producing abnormal growth.

Since nicotine produces identical forms as other reducing reagents, one can attribute the changes in form as due to the same cause. This inability of the tissues to maintain their normal energy level will therefore result in undifferentiated cells, which are the so-called cancer cells.

The experiments of Warburg (1923) have long ago demonstrated that cancer cells obtain their energy for growth mainly through glycolysis, which takes place in absence of oxygen, or at greatly reduced oxygen pressure.

Summary and Conclusion

When solutions of nicotine are used in experiments on growth of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, the larvae develop into abnormal shapes, called "exogastrula." Such shapes occur when certain reagents are used in sea water where these larvae develop. These reagents have been classified by Brooks as reducing reagents whereby the oxidation state is lowered and the energy level decreased, due to the negative oxidation-reduction potential produced. One can therefore conclude that nicotine is also a reducing reagent.

The effects of nicotine are described. Various concentrations produce differing results in form. However they all are immature cells, and demonstrate the undifferentiation of organization which is the chief property apparently of so-called cancer cells.

Comparisons are made between abnormal growth in the higher classifications of the animal kingdom with that in sea urchins. Comparisons are also made between the effects of lowered redox potentials in decreasing the rate of oxygen consumption in cells both normal as found by Barron and that of cancer cells as found by Warburg.

Reference is also made to the use of filters in cigarettes, which are so extensively advertised as filtering out the harmful products of combustion, but indirectly approving of the inhalation of the nicotine. Since the results described above were obtained in the absence of any extraneous product, but of nicotine alone, one can conclude that the so-called "filtering out" method is of no avail unless it also filters out the nicotine.

These experiments show definitely that the correct oxidation-reduction potential is the essential factor for normal growth; that nicotine produces a negative potential as a reducing reagent which is the cause of the form of undifferentiated growth or "cancer-cells."

References

- Barron, E. S. G., 1929: The effect of methylene blue on the oxygen consumption of sea urchin eggs. *Jour. Biol. Chem. (Amer.)* 81, 445-448.
- Brooks, M. M., 1932: The effect of methylene blue on HCN and CO poisoning. *Amer. J. Physiol.* 102, 145-147; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 29, 1228.
- 1933: The effects of respiratory poisons and methylene blue on cleavage of certain eggs. *Biol. Bull.* 65, 356.
- 1934: The effects of methylene blue and other oxidation-reduction indicators on experimental tumors. University of California Publications in Zoology 39, No. 14; 293-302.
- 1946: The mechanism of the fertilization of eggs. *Growth* 10, 391-410.
- 1954: The effects of changes of redox potential on the growth of marine eggs, *Paracentrotus lividus*. *Vie et Milieu*, V, Dec.
- 1956: Changes in the growth of marine eggs as affected by changes in redox potential. *Protoplasma* 46, 104-107.
- 1959: Negative oxidation-reduction potential as the factor for exogastrulation in sea urchins. *Protoplasma* 51, 131-153.
- 1960: Negative oxidation-reduction potentials resulting from the use of auxin in plants and tobacco smoke on animal cells. *Protoplasma* 51, 620-631.
- Child, C. M., 1948: Exogastrulation by sodium azide and other inhibiting conditions in *Strongylocentrotus purpuratus*. *J. Exper. Zool.* 102, No. 1, 1-38.
- 1953: Indicator patterns in relation to echinoderm exogastrulation. *Biol. Bull.* 105, 62-79.
- Herbst, C., 1896: Die formative Wirkung des Lithiums auf befruchtete Eier von *Asterias glacialis*. *Arch. Entw.mechan.* 2, 435-516.
- Ochsner, A., 1954: Smoking and Cancer. Julian Messner Co., New York.
- Warburg, O., 1923: Versuche an überlebendem Carcinomgewebe. *Biochem. Z.* 142, 317-333.

Usefulness of Autofluorescence Tests as Criterion of Life in Plant Tissues

By

H. R. Oppenheimer and B. Jacoby

Department of Plant Physiology, Faculty of Agriculture, Hebrew University,
Rehovot, Israel

(Received June 17, 1960)

A. Introduction

In studies of plant resistance to external factors, as drought and heat, a quick orientation on the damage inflicted upon cells or tissues is often desired. While obvious necrotic changes, as discoloration, not always take place in death, cells may also be either living or dead if, in early stages of damage, one observes changes in the appearance of the protoplasm, looking opaque, granular or foamy instead of transparent and vitreous. Irregular agglomeration of chloroplasts or easy visibility of the nucleus suggesting coagulation are neither always certain indications of death.

Changes of osmotic properties, like exosmosis of anthocyanins, are of great use as criteria of death in appropriate objects, while lacking accumulation of vitally staining dyes, as neutral red, proves helpful in others. The latter, however, will often not accumulate in the vacuole of every cell, but produce a scattered pattern of coloration even in untreated control sections.

It was, therefore, very welcome when Larcher [3] suggested observation of fresh sections in ultraviolet light as useful for the purpose. Larcher stated that in living sections of evergreen leaves, like ivy, in *Globularia cordifolia* and in many mediterranean and alpine evergreens, the living cells emit a stronger or weaker light from their vacuoles when irradiated by the ultraviolet beam. In contrast, the dead ones look dark or show some residual fluorescence at most in their walls.

While this author did not publish detailed protocols on the behaviour of individual cells or cell groups checking his method against others like vital staining or plasmolysis, he arrives at the conclusion that in suitable plants, the equation "fluorescent = living cell" was true above any doubt while in other cases, the criterion may fail.

Considering the great biological interest of the problem, we have tested leaves of a hundred species representing various taxonomic groups and life forms by Larcher's method. The present report summarizes our results.

B. Materials and Methods

The leaves were collected from plants growing wild at Rehovot or cultivated as ornamentals in the arboretum of the Agricultural Faculty or in gardens, mainly of the same institution. The species chosen belong to 57 different families of vascular plants, according to the following specification.

List of the investigated species

Polypodiaceae: (1) *Nephrolepis* spec. Cycadaceae: (2) *Cycas revoluta*. Pinaceae: *Pinus pinea*. (4) *Pin. canariensis*. (5) *Cedrus deodara*. Hydrocharitaceae: (6) *Anacharis* (Elodea) *canadensis*. Graminaceae: (7) *Sorghum ceruum*. (8) *Stenotaphrum secundatum*. Cyperaceae: (9) *Cyperus alternifolius*. (10) *Cyp. alopecuroides*. Palmaceae: (11) *Phoenix dactylifera*. Araceae: (12) *Zantedeschia aethiopica*. (13) *Arisarum vulgare*. Commelinaceae: (14) *Zebrina pendula*. Liliaceae: (15) *Hemerocallis* spec. (16) *Allium ampeloprasum*. (17) *All. neapolitanum*. (18) *Asparagus sprengeri*. (19) *Ruscus hypoglossum*. Amaryllidaceae: (20) *Narcissus tazetta*. Iridaceae: (21) *Iris mesopotamica*. Musaceae: (22) *Musa cavendishii*. Cannaceae: (23) *Canna indica*.

Moraceae: (24) *Ficus elastica*. (25) *Fic. pumila*. Urticaceae: (26) *Urtica urens*. Aristolochiaceae: (27) *Aristolochia elegans*. Polygonaceae: (28) *Emex spinosus*. Nyctaginaceae: (29) *Bougainvillea glabra*. Phytolaccaceae: (30) *Phytolacca dioica*. Caryophyllaceae: (31) *Dianthus caryophyllus*. (32) *Gypsophila rokejeka*. Ranunculaceae: (33) *Delphinium ajacis*. Berberidaceae: (34) *Mahonia tenuifolia*. Magnoliaceae: (35) *Magnolia grandiflora*. Lauraceae: (36) *Laurus camphora*. (37) *Laur. nobilis*. (38) *Persea americana*. Papaveraceae: (39) *Papaver rhoeas*. Cruciferae: (40) *Alyssum benthami*. (41) *Capsella bursa pastoris*. Rosaceae: (42) *Rosa polyantha*. (43) *Rosa damascena*. (44) *Pyracantha crenato-serrata*. (45) *Raphiolepis umbellata*. Leguminosae: (46) *Ceratonia siliqua*. Geraniaceae: (47) *Pelargonium peltatum*. (48) *Pel. zonale*. Oxalidaceae: (49) *Oxalis? variabilis*. Tropaeolaceae: (50) *Tropaeolum maius*. Rutaceae: (51) *Citrus limon*. (52) *Citr. sinensis*. Euphorbiaceae: (53) *Mercurialis annua*. (54) *Ricinus communis*. Buxaceae: (55) *Simmondsia californica*. Anacardiaceae: (56) *Pistacia lentiscus*. (57) *Schinus molle*. (58) *Mangifera indica*. Rhamnaceae: (59) *Rhamnus palaestina*. (60) *Rh. alaternus*. Malvaceae: (61) *Malva parviflora*. (62) *Hibiscus rosa sinensis*. (63) *Lagunaria patersonii*. Violaceae: (64) *Viola odorata*. Myrtaceae: (65) *Eugenia pitanga*. (66) *Callistemon puniceum*. (67) *Melaleuca armillaris*. (68) *Eucalyptus citriodora*. Oenotheraceae: (69) *Oenothera drummondii*. Araliaceae: (70) *Hedera helix*.

Plumbaginaceae: (71) *Plumbago capensis*. Oleaceae: (72) *Olea europaea*. Loganiaceae: (73) *Buddleia madagascariensis*. Apocynaceae: (74) *Carissa grandiflora*. (75) *Lochnera* (Vinca) *rosea*. (76) *Nerium oleander*. (77) *Thevetia nerifolia*. Asclepiadaceae: (78) *Cryptostegia madagascariensis*. Boraginaceae: (79) *Echium angustifolium*. Verbenaceae: (80) *Citharexylum quadrangulare*. (81) *Lantana montevidensis*. (82) *Duranta plumieri* var. fol. variegatis. Labiatae: (83) *Salvia splendens*. (84) *Ajuga reptans*. Solanaceae: (85) *Lycium* aff. *halimifolium*. (86) *Withania somnifera*. (87) *Petunia hybrida*. Scrophulariaceae: (88) *Verbascum sinuatum*. (89) *Antirrhinum maius*. Bignoniaceae: (90) *Pyrostegia ignea*. (91) *Jacaranda mimosifolia*.

Acanthaceae: (92) *Strobilanthes anisophyllus*. Myoporaceae: (93) *Myoporum acuminatum*. Caprifoliaceae: (94) *Lonicera japonica*. Compositae: (95) *Arctotis stoechadifolia*. (96) *Dimorphotheca ecklonis*. (97) *Gazania? longiscapa*. (98) *Senecio vernalis*. (99) *Sonchus oleraceus*. (100) *Vittadinia australis*.

The tests were carried out in February, 1960.

In collecting the leaves, we chose healthy and young but full-grown material. Pieces of the leaves were inserted into slits of prismatic fragments of carrot roots and cut transversely by means of a sharp razor. They were observed in water between ordinary glass slides and coverslips using a large stage Leitz "Ortholux" microscope.

The slides were examined in transmitted ultraviolet light since it was found that also available reflected light rendered no better results. The microscope is fitted out with two Philips high vacuum mercury lamps and filters excluding visible and short-wave ultraviolet light, transmitting ultraviolet above 3,000 Å. By a switch, the ultraviolet illumination can easily be replaced by visible light from low voltage lamps. This arrangement permits to observe—in both types of illumination—single cells or cell groups situated in the thinner portions of the sections and especially at their thinnest margins. By situation sketches, it became possible to examine if marked fluorescent cells appeared normal in visible light, to identify non-luminescing cells as apparently damaged and to follow up the behaviour of single luminescing cells which might extinguish gradually. Especially, we were able to examine the condition of apparently intact single cells in plasmolysis. In leaves reacting positively to Larcher's test, we investigated control sections stained by neutral red.

The distribution of tissues in the sections and the colour and intensity of fluorescence in the successive layers were recording in the minute-book. The denomination of the colours is subjective. We disagreed sometimes about the colour of a certain layer, but agreed that the colour of one and the same layer varies considerably with thickness. Thus, in *Tropaeolum maius*, the palisades looked bluish in very thin, yellow in thicker portions of the same sections. Under these conditions, it remains uncertain if the exact description of colours by aid of colour tables is of much value. Anyhow, our observations seem to agree quite well with those of authors, like Klein and Linser [2] and Kasy [1]. The intensity of autofluorescence was recorded in general terms, as strong, weak or lacking.

After recording anatomical structure and autofluorescence in life, the sections were heated for a moment to the boiling point and reexamined immediately upon cooling off. The changes in fluorescence were recorded.

C. Results

1. Fluorescence in life

In general, we found a pronounced fluorescence of the walls in the epidermis and in the lignified bast fibres and vascular bundles. The cuticle was often white (e.g. in the laurel and *Rhamnus palaestina*) or, yellow, the epidermis wall blue, yellow or brown. Fibres and vascular tissues looked brilliant prussian blue, mesophyll walls yellowish brown.

Cell contents of epidermis and inner water storing tissues of evergreens evinced no or very weak fluorescence, e.g. a faint green in *Cytha-rexylum*. In contrast to this, fluorescence of the cells' interior was pronounced in most cases in the mesophyll the cells of which looked light or whitish blue in 60% of the studied plants, but in 25% it was from whitish to orange-yellow¹ and, more rarely (10%) creamy to pure white. These colours often merged into each other, as in *Nerium* where the palisades looked bright bluish orange.

The fluorescence of the cell contents can be general or distributed patch-wise, or restricted to a varying proportion of scattered cells. In many leaves, it is more pronounced in the palisades than in the spongy parenchyma, in others, the reverse is true. The successive layers of palisades often differ in the intensity of light emission. Often the external portions of the first layer adjoining the epidermis form fluorescent "heads," or the medium portions of this or deeper layers emit stronger light than the rest.

The rubin red colour of the chlorophyll grains often prevails so much that the fluorescence of the vacuoles becomes invisible (*Myrtaceae*, like *Callistemon*, *Eugenia*, *eucalypts*). In other cases (*Allium*, *Zantedeschia*, *Papaver*, *Dimorphotheca*, *Senecio*), the chlorophyll grains adjoining the walls form red frameworks around blue, yellow or white centres. Since the red colour very rarely disappears in death, it often hinders the execution of the vitality test considerably. Kasy [1] succeeded in eliminating this interference by centrifugation, at least in certain cases.

Fluorescence of morphological or physiological idioblasts was frequently observed. Thus we saw bright chrome yellow cells scattered mainly in the second palisade and the adjoining lower layers in *Laurus camphora* and in the latter alone in *Mangifera indica*. The colour of such chrome yellow idioblasts often does not disappear in death. We saw it frequently near bundles of the central region of the leaves (*Ficus elastica*, etc.). Single large cells in the compound epidermis of *Ficus elastica* fluoresced blue in colourless surroundings. The contrasting colour can be concentrated in drops or other plasmatic inclusions. Drops of bright yellow colour—the chemical character of which remains obscure—were seen in every mesophyll cell of *Arisarum vulgare*.

The cytoplasm including the nucleus is non-fluorescent, as a rule, and there seems to be general agreement that the main seat of the cell's fluorescence is the vacuole. An opposite behaviour was observed by us only in the palisades of *Bougainvillea glabra* where the cytoplasm, instead of the vacuole, seemed to be responsible for the strong milky-bluish colour. In plasmolysis, the fluorescent zone shrinks, as would be expected. We did not see different colours in cytoplasm and vacuole—as Kasy in *Orchis ustulata*—which would facilitate the distinction.

Unusual colours observed were: brown-violet, not disappearing in death

¹ The orange colour might be due to mixture of yellow in the vacuolar sap with red in the chlorophyll.

in the palisades of *Mercurialis annua*; violet disappearing in death, in those of *Arisarum vulgare*, bright sulphur yellow in the whole mesophyll of *Echium angustifolium*.

2. Changes in death

Generally speaking, we saw in death no changes in the fluorescence of the cell walls. In 54 of the studied plants, the fluorescence of the cell contents disappeared altogether or became very faint. In these cases, a dead section can be distinguished from a living one at first glance. In other cases, obvious changes of colour took place which might, with caution, be accepted for the diagnosis of death. Thus the palisades of *Urtica* look whitish instead bluish to violet, in death. The palisades of *Buddleia* change their colour from bluish to pink and green. In the rest of the cases, we found cell fluorescence of no use for the purpose in view because fluorescence was too weak, scattered, or lacking in life and thus no obvious changes took place in death. Failure can be due also to prevalence of red chlorophyll, of bright colours in the walls or, in one case, to a damaged condition of the tested leaf in life.

3. Suitability of species

The following plants, listed here by serial numbers of the above list were found suitable for the vitality test by fluorescence microscopy. The indications + and ++, resp., represent increasing degrees of suitability, ++ indicating excellent objects while (+) means that the plants are not very suitable.

Species suitable for Larcher's test: 11+, 12+, 13+, 18+, 19+, 20+, 21(+), 24+, 26+, 27+, 28+, 29+, 31++, 32+, 33+, 35++, 39+, 40+, 41+, 42++, 43(+), 44(+), 45+, 47+, 48+, 49(+), 50+, 51+, 52+, 53(+), 54+, 55+, 57+, 59+, 60+, 61+, 62++, 63+, 69+, 70+, 72++, 73(+), 74(+), 75+, 76++, 77+, 79(+), 80+, 81+, 82+, 83+, 84+, 86+, 87+, 89+, 91+, 92+, 95+, 94+, 95+, 96+, 97+, 100+.

A striking change in death was in some objects the appearance of a bright yellow colour in the mesophyll not observed in life. Such was the case in *Laurus nobilis*, *Gazania*, *Mahonia* and *Vittadinia* and seems to be due to a chemical reaction producing a substance of strong fluorescent properties.

4. Correspondence with other criteria of life

The irradiated sections were in some cases also tested by plasmolysis with 1 mol KCl or by vital staining with neutral red. A very satisfactory correlation of fluorescence, vital staining and plasmolysis was found with *Olea europaea*. A good correspondence of fluorescing and plasmolyzable cells was also observed in *Magnolia grandiflora*. General fluorescence of the mesophyll tissues coincided in *Oenothera drummondii* with a general response to KCl as a plasmolyticum. All these are plants with resistant

robust cells. An exceptional case was *Pelargonium peltatum* where cells which could not be plasmolyzed, continued to emit bluish light. But these were large highly hydrated and probably moribund cells which seemed to have been injured by sectioning. It is well known to anatomists that certain leaves undergo necrobiotic changes already within a few minutes after isolation and lesion of their tissues. Sometimes enzymes, as polyphenol oxydases, are involved in these changes.

Therefore, a good correspondence can only be expected in objects relatively resistant to injury. Not fluorescing cells surrounded by fluorescing ones may be damaged by the razor; and even if fluorescence persists, the cell may be unable to accumulate solutes, as dyes nor be impenetrable to the entrance of substances plasmolyzing healthy cells.

A doubtful criterion of life is the regular distribution of the chloroplasts along the walls, i.e. their arrangement might be systrophic indicating some disturbance or damage while the semipermeability of the plasmatic border layers is still intact. Such cells can therefore sometimes be plasmolyzed and fluoresce. If, however, agglutination or darkening of the chloroplasts is observed, we suppose that the damage has become irreparable.

5. Anatomical peculiarities of the tested leaves

Incidentally, it should be pointed out that many of the tested plants had dense, palisade-like mesophyll cells, not only at their upper (adaxial), but also at their lower (abaxial) side, as *Gazania*, *Oenothera*, *Gypsophila*. If the layer adjoining the lower epidermis is not composed of densely packed up cells, at least one observes an elongate, instead of isodiametric character of the cells with orientation of their longer axis in a direction perpendicular to the lower epidermis. Bump-like protuberances of the spongy parenchyma struck the eye in *Malva parviflora*.

D. Discussion and Conclusions

The survey clearly demonstrates that Larcher's fluorescence test for life is of great diagnostic value in the majority of the examined plants though it must be used with discretion. Our observations confirm—at least in certain cases—that the seat of the fluorescence is in the vacuole. In *Lantana* and *Urtica*, we observed in death, as the Austrian botanists, a clearing up of the dark background by exosmosis of bluish fluorescing substances apparently diffusing from the vacuoles.

Little can be learned from the results about plant groups which are more or less suitable for the test. The investigated ferns, conifers, glumiflores and three of the four *Liliaceae* disappointed. On the other hand, the tested representatives of *Rosaceae*, *Malvaceae*, *Apocynaceae* and *Compositae* rendered satisfactory results. Life duration and physiognomy seem to be of no importance. There were—in contrast to the impression one gets from Larcher's limited data—many evergreen shrubs and trees without cell autofluorescence worth mentioning while many annual or perennial herbs possess definitely fluorescing cells. 25 herbs of 47 tested rendered positive

results while pines, eucalypts, *Melaleuca*, *Lauraceae* and *Pistacia* were found unsuitable.

It is tempting to speculate about the chemical character of the substances responsible for fluorescence in life, but it seems premature to discuss the matter before microchemical or microspectrographic research has paved the way for it. Klein and Linser [2] investigated the fluorescence of many pure substances occurring in plant cells. Among others, they found the following fluorescing: glucose, citric acid, inulin, phloroglucin, glycerin aldehyde, dioxycetone, diastase—all blue, and many other substances which might occur in the vacuolar sap—violet. In their opinion, the yellow to blue colour of the vacuolar sap is produced by glycosids and tannins. Larcher [3] considers the former as responsible for the fluorescence in rare cases only, and assumes that possibly not the tannins themselves but "impurities" accompanying them should be kept responsible for the fluorescent properties.

Concluding this report, we wish to stress the following species as highly recommendable for vitality studies by Larcher's test: *Magnolia grandiflora*, *Olea europaea*, *Nerium oleander*, *Dianthus caryophyllus*, *Myoporum acuminatum* and *Dimorphotheca ecklonis*. In their leaves fluorescence is both strong and general and disappears in death. In *Gazania*, *Lonicera* and *Oenothera*, fluorescence is general, too, but weaker. The latter has very resistant cells which seem quite suitable for cell physiological studies.

Summary

100 plant species belonging to 57 families, woody and herbaceous, have been examined for autofluorescence of their mesophyll cells in life and changes in death. Their majority evinced obvious changes—bluish, yellow or white tints of the cell contents disappearing and leaving behind only red chlorophyll fluorescence. In some cases changes of colour of diagnostic interest could be established. In certain leaves it could be demonstrated that the photoluminescing cells could also be plasmolyzed and vitally stained. So far, the character of the substances responsible for the fluorescence of these leaf cells remains obscure.

Bibliography

- [1] Kasy, R., 1951: Untersuchungen über Verschiedenheiten der Gewebeschnitten krautiger Blütenpflanzen in Beziehung zu entwicklungsgeschichtlichen Befunden Hans Winklers an Pfropfbastarden. S.B. Wien. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl. Abt. I, 160, 6—7, 509—572.
- [2] Klein, G., und H. Linser, 1950: Fluoreszenzanalytische Untersuchungen an Pflanzen. Österr. bot. Z. 79, 125—165.
- [3] Larcher, W., 1955: Schnellmethode zur Unterscheidung lebender von toten Zellen mit Hilfe der Eigenfluoreszenz pflanzlicher Zellsäfte. Mikroskopie (Vienna) 8, 9—10, 299—304.

Weitere Untersuchungen zur Osmoregulation der *Nitella*-Zelle

Von

Masashi Tazawa

Biologisches Institut, Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Osaka

Mit 15 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Juni 1960)

Der experimentelle Nachweis der Fähigkeit zur Osmoregulation setzt eine Technik voraus, welche die willkürliche Modifizierung des osmotischen Wertes erlaubt. Das von Kamiya und Kuroda (1956) entwickelte Verfahren ermöglicht es, aus einer Internodialzelle von *Nitella flexilis* Zellhälfthen sehr unterschiedlichen osmotischen Wertes (etwa $\frac{1}{3}$ bis 3 des normalen) zu gewinnen. Derart behandelte Zellen sind in der Lage, innerhalb einiger Tage ihren normalen osmotischen Wert wieder herzustellen.

Abgesehen davon ist schon an vielen pflanzlichen Objekten festgestellt worden, daß der osmotische Wert der Zelle durch verschiedene Außenfaktoren stark beeinflußt wird (vgl. Blum 1958 und dort zitierte Literatur). So fand Tazawa (1957) bei Internodialzellen von *Nitella flexilis* einen deutlich von der Salzkonzentration der Außenlösung abhängigen osmotischen Wert.

Vorliegende Arbeit soll zunächst klären, in welcher Weise der osmotische Wert der normalen Zelle von *Nitella flexilis* durch verschiedene Außenfaktoren beeinflußt wird; auf diesen Grundlagen bauend, wird sodann versucht, das Wesen und die Wirkungsweise der Osmoregulation der behandelten Zelle verständlich zu machen.

I. Material und Versuchsanordnungen

Als Untersuchungsmaterial diente die Internodialzelle von *Nitella flexilis*, die im Laboratorium im künstlichen Nährmedium (Tab. 1) bei Tageslicht kultiviert wurde.

Die Einstellung abnormer osmotischer Werte in den Zellen erfolgte nach Kamiya und Kuroda (1956). Das Wesentliche dieser Methode besteht in folgendem: Eine Internodialzelle von *Nitella flexilis* wird mit ihrer einen Hälfte Leitungswasser und mit der anderen einer hypotonischen Saccharose-lösung ausgesetzt, ohne sie hierbei zu beschädigen; dadurch stellt sich zwi-

schen den beiden Zellhälften eine Saugkraftdifferenz ein, welche die Ursache eines Wassertransportes von der „Wasserseite“ zur „Saccharoseseite“ ist. Der Zellsaft auf der Wasserseite wird dadurch verdünnt und auf der Saccharoseseite in seiner Konzentration erhöht. Mit einer Fadenschlinge läßt sich diese Zelle nun in der Mitte durchschnüren, wodurch man aus einer Internodialzelle zwei Zellen mit unterschiedlichem osmotischem Wert erhält.

In Vorversuchen zeigte es sich, daß Zellen mit einem zu niedrigen osmotischen Wert (kleiner als 0,15 mol) häufig zu schnell abstarben. Es wurde daher der osmotische Wert um etwa 0,1 mol modifiziert. Der osmotische Wert einer Ausgangszelle sei z. B. 0,27 mol; dann erhält man eine Zelle mit einem übernormalen osmotischen Wert von 0,37 mol und eine andere mit einem unternormalen von 0,17 mol.

Tab. 1. Zusammensetzung des künstlichen Nährmediums für die Stammkultur von *Nitella flexilis*.

KCl	2,5 $\times 10^{-5}$ mol	Ca(NO ₃) ₂	1,25 $\times 10^{-4}$ mol
KNO ₃	5,0 $\times 10^{-6}$ mol	MgSO ₄	1,0 $\times 10^{-4}$ mol
NaCl	2,0 $\times 10^{-4}$ mol	KH ₂ PO ₄	Spur
CaCl ₂	1,25 $\times 10^{-4}$ mol			

Zum Versuche wurde eine Internodialzelle in einen kleinen Glastubus gebracht, welcher 3 ml Versuchslösung enthielt. Um die Analyse der experimentellen Ergebnisse zu vereinfachen, kamen als Untersuchungslösungen ionenfreies Wasser und verschiedenen konzentrierte einfache Salzlösungen von KCl, NaCl und CaCl₂ zur Verwendung.

Zur Belichtung des Versuchsmaterials wurden vier Leuchtstoffröhren von je 40 Watt (Mazda FL., weiß) benutzt. Die Lichtintensität ließ sich durch Ausschalten einiger Leuchtstoffröhren oder durch Entfernen von der Lichtquelle variieren. Die Messung der Lichtenergie und Beleuchtungsstärke erfolgte mit einer Thermosäule und einem Luxmeter. Bei den meisten Lichtversuchen betrug die Beleuchtungsstärke 2000 Lux (= 1500 erg/cm² · sec), da schon mit dieser Lichtintensität die maximale Wirkung auf den osmotischen Wert der Zelle erreicht ist (vgl. Abb. 3).

Die Bestimmung des osmotischen Wertes der Zelle erfolgte mit Hilfe der „Turgorwaage“ (Tazawa 1957). Mit dieser Methode läßt sich der osmotische Wert ohne Plasmolyse bestimmen und seine Veränderungen können an einer einzelnen Zelle zeitlich mühelos verfolgt werden. Bei dieser Methode dürfte der Meßfehler kleiner als 0,002 mol sein.

Zur Bestimmung der Kationen erwies sich folgendes Verfahren als zweckmäßig: Die Internodialzelle wurde in einen Glastubus mit 3 ml entionisiertem Wasser gebracht und dann in einen Kühlschrank (−5° C) gestellt. Diese Gefrierbehandlung ließ die Zelle meistens innerhalb eines Tages absterben. Um zu gewährleisten, daß die Diffusion der Ionen aus der Zelle in die Außenlösung beendet war, ließen wir die Zelle noch einige Tage in dem Tubus. Nach dieser Vorbehandlung erfolgte die Bestimmung der Kationen in der Außenlösung mit einem Beckmanschen Flammenphotometer. Die Analyse beschränkte sich auf die Kationen K⁺, Na⁺ und Ca⁺⁺, da diese

im Zellsaft relativ am stärksten konzentriert vorhanden sind. Zur Ermittlung der Kationenkonzentration in der Zelle muß dann natürlich die in der Außenlösung bestimmte Kationenkonzentration mit dem Volumenverhältnis zwischen der Außenlösung und der Zelle multipliziert werden. Um dann weiter die osmotische Konzentration zu berechnen, die die Kationen mit den Anionen in der Zelle einnehmen, wurde die Kationenkonzentration mit dem isotonischen Koeffizienten multipliziert; dies unter der Annahme, daß

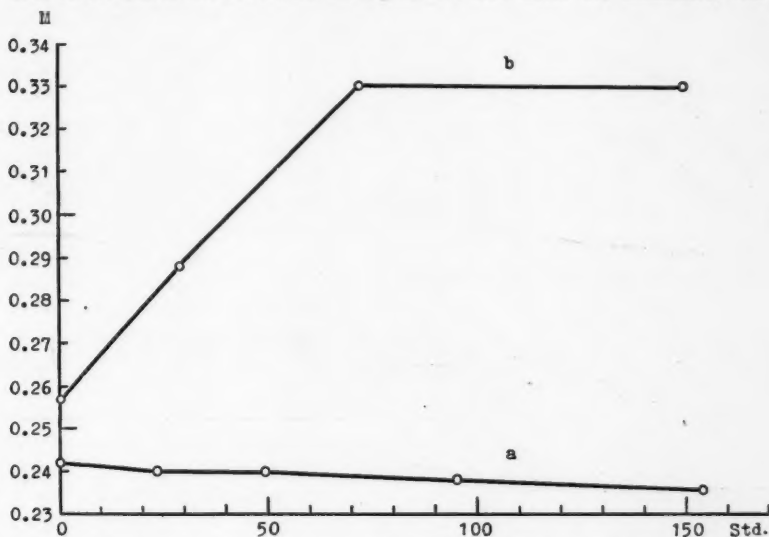


Abb. 1. Zeitliche Änderung des osmotischen Wertes der *Nitella*-Zelle in 10^{-3} mol. KCl-Lösung unter (a) Dunkel- und (b) Lichtbedingungen.

die Anionen als Cl^- vorliegen. Er lautet für KCl, NaCl und CaCl_2 1,82, 1,80 und 2,59 (Sakamura 1952).

Die Veränderung der Ionenkonzentration der Außenlösung während der Versuche ließ sich ebenfalls mit dem Beckmanschen Flammenphotometer bestimmen. Die Umrechnung der Veränderung der Ionenkonzentration und der osmotischen Konzentration in der Zelle erfolgte in gleicher Weise wie oben.

Während der Versuche betrug die Temperatur im Sommer $26 \pm 1^\circ \text{C}$ und im Winter $23 \pm 1^\circ \text{C}$.

II. Osmotisches Verhalten der normalen Zelle

1. Lichtversuche

a) Einfluß der Salzkonzentration des Mediums auf die Lichtzunahme des osmotischen Wertes

Abb. 1 gibt die zeitlichen Veränderungen des osmotischen Wertes einer Zelle unter Licht- und Dunkelbedingungen wieder. Man sieht, daß in 10^{-3} mol. KCl-Lösung der osmotische Wert der Zelle durch Belichtung mit

2000 Lux stark ansteigt (Kurve *b*) und im Dunkeln geringfügig abnimmt (Kurve *a*).

Wie verhält sich nun die Zelle in verschiedenen konzentrierten einfachen

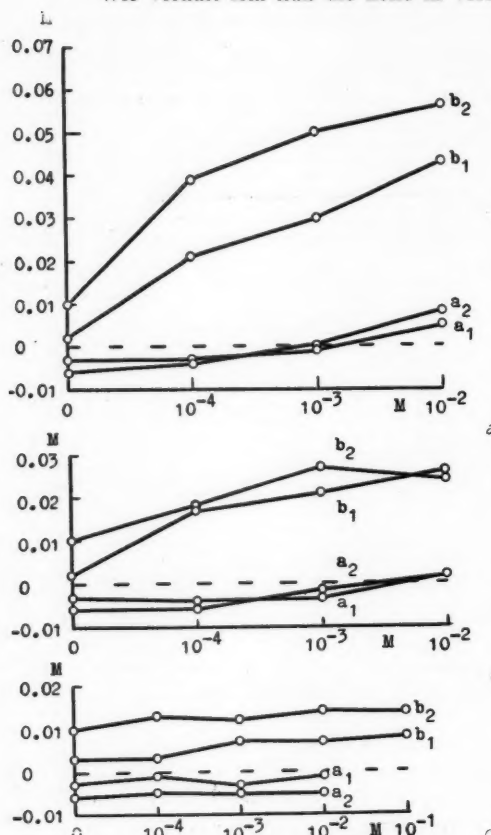


Abb. 2. Die Abhängigkeit der Veränderung des osmotischen Wertes der *Nitella*-Zelle von der Salzkonzentration der Außenlösung. *a*₁, *a*₂: Werte nach 24 und 48 Std. im Dunkeln. *b*₁, *b*₂: Werte nach 24 und 48 Std. im Licht. *a*: KCl, *b*: NaCl, *c*: CaCl₂.

Wert verändert sich in den Lösungen genau so wie in ionenfreiem Wasser. Ein Konzentrationseffekt ist kaum zu bemerken.

b) Unabhängigkeit der Lichtzunahme des osmotischen Wertes vom Turgor

Mit der Zunahme des osmotischen Wertes der Zelle erhöht sich selbstverständlich auch der Turgor bzw. der Wanddruck der Zelle. Die Tatsache,

Salzlösungen? Abb. 2 stellt die Veränderungen des osmotischen Wertes unter Licht- und Dunkelbedingungen in verschieden konzentrierten KCl-, NaCl- und CaCl₂-Lösungen dar, wobei Kurven *a*₁ und *a*₂ die Veränderungen des osmotischen Wertes im Dunkeln und Kurven *b*₁ und *b*₂ diejenigen im Licht je nach 24 und 48 Stunden zeigen. Die Lichtintensität betrug wieder 2000 Lux. In KCl- und NaCl-Lösungen (Abb. 2a, b) wird der Anstieg des osmotischen Wertes im Licht — „Lichtzunahme“ — mit der Zunahme der Salzkonzentration größer. Im Vergleich dazu verändert sich der osmotische Wert der Zelle im Dunkeln (*a*₁, *a*₂) sehr wenig. In ionenfreiem Wasser oder in einer ionenarmen Lösung (10⁻⁴ mol) nimmt der osmotische Wert allmählich ab, in ionenreicher (10⁻³, 10⁻² mol) dagegen etwas zu. Die Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, daß der Konzentrationseffekt auf den osmotischen Wert der Zelle im Licht viel stärker zum Ausdruck kommt als im Dunkeln.

Ganz anders verhält sich die Zelle in CaCl₂-Lösungen (Abb. 2c). Der osmotische

daß die Lichtzunahme mit der Zeit schwächer wird und endlich zum Stillstand kommt (vgl. Abb. 1 b), könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, daß der gleichzeitig zunehmende Wanddruck auf die Erhöhung des osmotischen Wertes regulierend wirkt. Um die Lichtzunahme des osmotischen Wertes turgeszenter Zellen mit derjenigen turgorloser zu vergleichen,

Tab. 2. Der Einfluß des Turgordruckes auf die Zunahme des osmotischen Wertes der *Nitellazelle* im Licht.

C_0 : Anfänglicher osmotischer Wert in mol. ΔC : Zunahme des osmotischen Wertes nach jeweiligen Stunden in Klammern.

Zelle	Lösung	Lichtintensität	C_0	$\Delta C_{(22)}$	$\Delta C_{(46)}$	$\Delta C_{(73)}$
1	10^{-3} mol KCl	2000 Lux	0,243	0,032	0,054	0,068
2			0,247	0,030	0,050	0,063
3			0,250	0,027	0,048	0,063
4	10^{-3} mol KCl	2000 Lux	0,252	0,026	0,051	0,071
5	+		0,243	0,025	0,050	0,061
6	0,25 mol Saccharose		0,250	0,023	0,047	0,060
7	10^{-3} mol KCl	0 Lux	0,248	0		
8	+		0,243	0,001		
9	0,25 mol Saccharose		0,252	0,001		

wurde der Versuch in 10^{-3} mol. KCl-Lösung mit und ohne Saccharose durchgeführt. Da die osmotischen Werte der Zellen zu Beginn des Versuches ungefähr 0,25 mol betrugen (vgl. Tab. 2), mußten die Zellen in der Lösung mit 0,25 mol Saccharose beinahe turgorlos sein. Tab. 2 zeigt nun, daß die Lichtzunahme in dieser Lösung genau so stark ist wie in der einfachen KCl-Lösung. Der Turgor übt demnach keinen Einfluß auf die Lichtzunahme des osmotischen Wertes aus.

c) Abhängigkeit der Lichtzunahme des osmotischen Wertes von der Lichtintensität

Gemessen wurde die Lichtzunahme in 10^{-3} mol. KCl- und NaCl-Lösung bei verschiedenen Lichtintensitäten. Abb. 3 zeigt die Zunahme des osmotischen Wertes nach zweitägiger Belichtung, wobei die Beleuchtungsstärke bis auf 6000 Lux erhöht wurde. Bis etwa 1000 Lux ist die Lichtzunahme stark von der Lichtintensität abhängig. Die Erhöhung der Lichtintensität über 1000 Lux hatte aber keinen bedeutenden Einfluß auf die Lichtzunahme mehr.

d) Spektrale Abhängigkeit der Lichtzunahme des osmotischen Wertes

Zur Erzielung der verschiedenen Spektralbereiche standen drei Farbgläser von Mazda, V-R₂D (rot, max. 650 m μ), V-G₁B (grün, max. 520 m μ)

und V-B₃B (blau, max. 450 m μ), zur Verfügung. Die Untersuchungsobjekte hatten die gleiche Entfernung von der Lichtquelle, weil dabei die Lichtenergien unter den Farbgläsern ungefähr gleich waren. Bei Versuch I von Tab. 3 betrug die Energie ohne Filter 1400 erg/cm². sec und unter dem jeweiligen Filter etwa 130 erg/cm². sec. Das Ergebnis zeigt klar den stärkeren

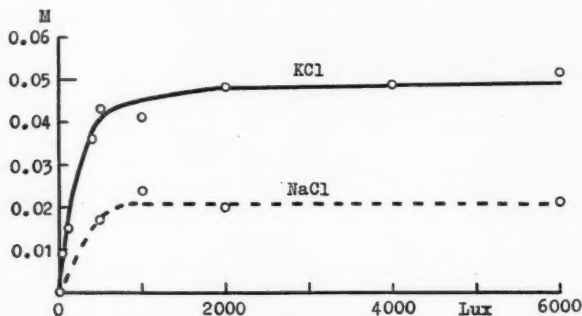


Abb. 3. Die Abhängigkeit der Zunahme des osmotischen Wertes der *Nitella*-Zelle von der Lichtintensität. Ausgezogene Kurve: in 10⁻³ mol. KCl-Lösung, gestrichelte Kurve: in 10⁻³ mol. NaCl-Lösung.

Anteil des roten und blauen Lichtes an der Lichtzunahme. Hingegen besitzt das grüne Licht keine bedeutende Wirkung. An diesem Ergebnis ändert auch die Einstrahlung gut der doppelten Energie nichts (vgl. Tab. 3, Ver-

Tab. 3. Die Zunahme des osmotischen Wertes der *Nitellazelle* bei Anwendung verschiedener Farblichter.

E: Lichtenergie in erg/cm². sec. ΔC : Zunahme des osmotischen Wertes in mol.

Versuch	Zeit in Stunden	Blau		Grün		Rot		Weiß	
		E	ΔC	E	ΔC	E	ΔC	E	ΔC
I	19	126	0,010	120	0,001	137	0,018	1400	0,023
	46		0,016		0,007		0,034		0,047
II	22	275	0,021	267	0,007	297	0,022		
	46		0,035		0,015		0,030		

such II). Danach kann man auf eine Beziehung zur Lichtabsorption des Chlorophylls schließen, die ja im blauen und roten Bereich des Spektrums ihre Maxima zeigt.

e) Einfluß von Phenylurethan auf die Lichtzunahme des osmotischen Wertes

Um der obigen Vermutung nachzugehen, wurde der Einfluß eines Hemmstoffs der Photosynthese auf die Lichtzunahme untersucht. Phenylurethan erwies sich als geeignet. Abb. 4 zeigt die Veränderung des osmotischen Wertes der Zelle in 10⁻³ mol. KCl-Lösung beim Zusatz von Phenylurethan

verschiedener Konzentrationen unter Lichtbedingungen (2000 Lux). Der Zusatz von 5×10^{-4} mol Phenylurethan hat so gut wie keinen Einfluß auf die Zunahme des osmotischen Wertes im Licht. Mit zunehmender Konzentration von Phenylurethan wird jedoch die Lichtzunahme schwächer. Beim Zusatz von $2,5 \times 10^{-3}$ mol Phenylurethan läßt sie sich beinahe völlig unterdrücken. Die gestrichelte Kurve in Abb. 4 zeigt, daß die Hemmung durch Phenylurethan reversibel ist. Hierzu wurde die Zelle zunächst zwei Tage im Licht der Lösung von 10^{-3} mol KCl mit $2,5 \times 10^{-3}$ mol Phenylurethan ausgesetzt und danach in Lösung von 10^{-3} mol KCl umgesetzt. Der osmotische Wert der Zelle, der sich in der Lösung mit Phenylurethan kaum veränderte, nimmt in der einfachen KCl-Lösung plötzlich zu.

Die Ergebnisse könnten darauf hindeuten, daß die Lichtzunahme des osmotischen Wertes mit der photosynthetischen Aktivität der Zelle verknüpft ist, womit gleichzeitig auch die Annahme, daß das für die Lichtzunahme verantwortliche Pigment das Chlorophyll sei, stärker unterstützt wird.

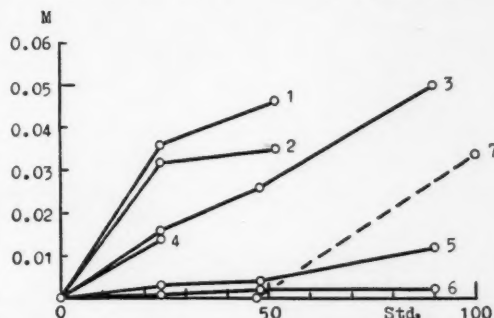


Abb. 4. Die Zunahme des osmotischen Wertes der Nitella-Zelle in 10^{-3} mol. KCl-Lösung beim Zusatz von Phenylurethan verschiedener Konzentrationen (5×10^{-4} mol: Nr. 1, 2; 10^{-3} mol: Nr. 3, 4; $2,5 \times 10^{-3}$ mol: Nr. 5, 6) unter Lichtbedingungen. Die gestrichelte Linie (Nr. 7) zeigt, daß die zwei Tage lang durch $2,5 \times 10^{-3}$ mol Phenylurethan völlig unterdrückte Zunahme des osmotischen Wertes in reiner KCl-Lösung von 10^{-3} mol wieder einsetzt.

Tab. 4. Die Zunahme des osmotischen Wertes der Nitellazelle unter anaeroben Bedingungen.

ΔC : Zunahme des osmotischen Wertes in mol.

Lösung	10^{-2} mol KCl	10^{-2} mol KCl	10^{-2} mol KHCO_3	10^{-2} mol KHCO_3
Bedingung	Luft	Stickstoff	Luft	Stickstoff
ΔC	$0,041 \pm 0,014$	$0,021 \pm 0,012$	$0,060 \pm 0,008$	$0,061 \pm 0,009$
Zellenzahl	8	8	3	5

f) Lichtzunahme bei Ausschluß von O_2 und CO_2

Wenn die Lichtzunahme von der Photosynthese abhängig ist, kann sie in CO_2 -freiem Medium nicht vorhanden sein. Der Entscheidung hierüber dient folgender Versuch: Als Versuchsgefäße standen uns Thunberg-

Röhren zur Verfügung. Die Röhren, in den sich die Versuchslösung und die Zellen befanden, wurden dann einmal mit einer Pumpe evakuiert (10 mm Hg) und danach entweder mit Luft oder N_2 gefüllt. Bei der N_2 -Versetzung wiederholten wir das gleiche Verfahren sicherheitshalber dreimal. Als Versuchslösungen kamen 10^{-2} mol. KCl- und $KHCO_3$ -Lösung zur Verwendung. Unter anaeroben Bedingungen steht der Zelle in KCl-Lösung kein Material für die Photosynthese zur Verfügung; in $KHCO_3$ -Lösung dagegen ist dieses ausreichend vorhanden. Tab. 4 zeigt die Zunahme des osmotischen Wertes der Zelle nach zweitägiger Belichtung unter verschie-

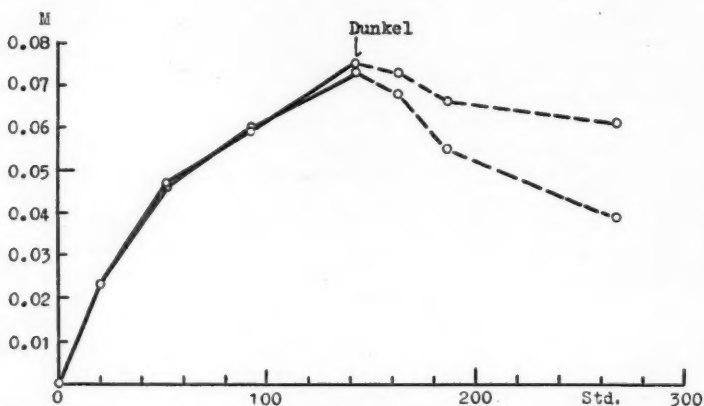


Abb. 5. Die ausgezogenen Kurven: Die Zunahme des osmotischen Wertes der *Nitella*-Zelle in 10^{-3} mol. KCl-Lösung durch Belichtung. Die gestrichelten Kurven: Die Abnahme des osmotischen Wertes nach Verdunkelung.

denen Bedingungen. In KCl-Lösung wird die Lichtzunahme in Stickstoff-Atmosphäre stark gehemmt, aber nicht völlig unterbunden. In Bicarbonat-Lösung tritt keine Hemmung auf.

Die Ergebnisse zeigen klar, daß die Zunahme des osmotischen Wertes im Licht nicht vom Sauerstoff, sondern stark von der Kohlensäure (CO_2 , HCO_3^-) im Außenmedium abhängig ist. Dies spricht also wieder für die Beteiligung der Photosynthese an der Lichtzunahme. Die Tatsache, daß sich der osmotische Wert der Zelle in der KCl-Lösung unter Ausschluß von CO_2 auch noch etwas, bei einigen Zellen sogar ziemlich stark (max. 0,038 mol in 2 Tagen) erhöht, könnte man dadurch erklären, daß 1. das intrazelluläre Bicarbonat-Ion oder das durch die Gärung produzierte CO_2 durch Photosynthese ermöglicht und 2. das Licht irgendeinen direkten Einfluß auf den Protoplasten ausübt. Die bis jetzt gewonnenen Erkenntnisse reichen nicht aus, um eine klare Entscheidung darüber zu erzielen, ob das Licht auch auf anderem Wege, also nicht über die Photosynthese, die Zunahme des osmotischen Wertes beeinflussen kann. Der quantitative Vergleich der Lichtzunahme mit der photosynthetischen Aktivität unter verschiedenen

Bedingungen und die genaue Bestimmung des Aktionsspektrums der Lichtzunahme könnten uns die ausschlaggebenden Resultate bringen.

2. Dunkelversuche

a) Einfluß der Salzkonzentration des Mediums auf das Niveau des osmotischen Wertes

Nachdem die den osmotischen Wert der Zelle erhöhende Wirkung des Lichtes gezeigt worden ist, gilt unsere Aufmerksamkeit nun dem osmotischen Verhalten der Zelle im Dunkeln. Abb. 5 zeigt deutlich, daß der einmal

Tab. 5. Die Veränderung des osmotischen Wertes der *Nitellazelle* in verschiedenen konzentrierten KCl-Lösungen unter Dunkelbedingungen.

Jeder Wert ist der Durchschnitt von fünf Zellen. ΔC : Differenz zu dem Ausgangswert (0,245 mol).

KCl-Konz. in mol	0	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}
Osmotischer Wert nach 1 Woche	0,223	0,226	0,229	0,237	0,259
ΔC	- 0,022	- 0,019	- 0,016	- 0,008	+ 0,014
Osmotischer Wert nach 2 Wochen	0,216	0,223	0,227	0,238	
ΔC	- 0,029	- 0,022	- 0,017	- 0,007	

durch das Licht erhöhte osmotische Wert der Zellen im Dunkeln wieder abnimmt. Es soll jetzt geklärt werden, wie weit das Niveau des osmotischen Wertes unter Dunkelbedingungen in verschiedenen konzentrierten Salzlösungen variiert werden kann.

Tab. 5 zeigt den osmotischen Wert der Zellen, nachdem diese unter Dunkelbedingungen ein oder zwei Wochen lang in einfachen KCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen kultiviert wurden. Die gemessenen Werte zeigen deutlich, daß die Zellen ihren osmotischen Wert in entionisiertem Wasser bzw. niedrig konzentrierter Salzlösung erniedrigen und in hoch konzentrierter (10^{-2} mol) erhöhen. Also ist das Niveau des osmotischen Wertes im Dunkeln wie im Licht von der Salzkonzentration der Außenlösung abhängig.

b) Dunkelzunahme

Obige Ergebnisse legen nahe, daß der einmal in gering konzentrierter Salzlösung erniedrigte osmotische Wert in hochkonzentrierter wieder zunehmen würde. Wird die Zelle z. B. in entionisiertem Wasser aufbewahrt, dann nimmt ihr osmotischer Wert allmählich ab (Abb. 6). Wie verändert sich nun der osmotische Wert einer solchen Zelle, wenn diese wieder in Salzlösung übertragen wird?

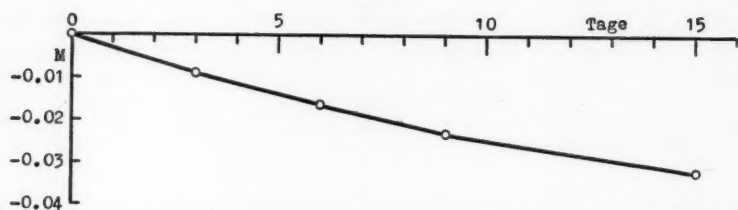


Abb. 6. Die Abnahme des osmotischen Wertes der *Nitella*-Zelle in entionisiertem Wasser unter Dunkelbedingungen. Jeder Wert ist der Durchschnitt von 14 Zellen.

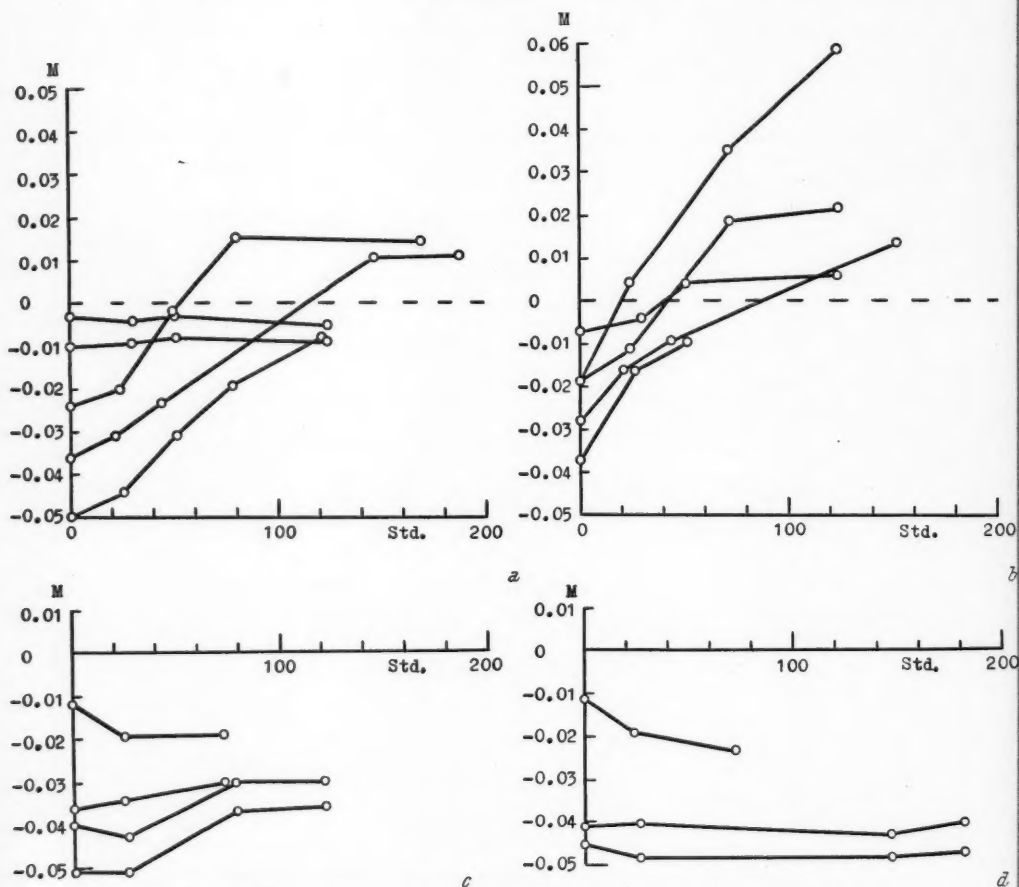


Abb. 7. Die Wiedererhöhung des einmal erniedrigten osmotischen Wertes der *Nitella*-Zelle unter Dunkelbedingungen in verschiedenen Salzlösungen. a: 10^{-3} mol KCl, b: 10^{-3} mol KCl, c: 10^{-3} mol NaCl, d: 10^{-3} mol CaCl_2 .

In Abb. 7 befanden sich die Zellen zuerst Zeiten von unterschiedlicher Dauer (3, 7, 14, 15, 16 Tage) in entionisiertem Wasser. Entsprechend dieser Vorbehandlungsdauer war die Abnahme des osmotischen Wertes auch unterschiedlich groß. Der Wechsel von Wasser zu 10^{-3} mol oder 10^{-2} mol KCl-Lösung ergab meistens einen ziemlich schnellen Rückgang des osmotischen Wertes zu dem Ausgangswert (Abb. 7 a, b). Die Wiedereinstellung des osmotischen Wertes ging manchmal so weit, daß er den Ausgangswert überschritt. Die Erhöhung des osmotischen Wertes im Dunkeln — Dunkelzunahme — ist anscheinend bei 10^{-2} mol stärker als bei 10^{-3} mol KCl; demnach ist die Dunkelzunahme genau so wie die Lichtzunahme von der Salzkonzentration abhängig. Erwähnt sei noch, daß in niedrig konzentrierter KCl-Lösung (10^{-4} , 10^{-5} mol) der osmotische Wert nicht zu- sondern gelegentlich sogar abnahm.

Hinsichtlich dieser Dunkelzunahme sind NaCl und CaCl_2 weniger wirksam als KCl (Abb. 7 c, d). Dies entspricht der Tatsache, daß die Lichtzunahme in KCl-Lösung stärker in Erscheinung tritt als in NaCl- oder CaCl_2 -Lösung. Für die Einstellung des höheren Niveaus im Dunkeln wie im Licht ist also KCl am wirksamsten.

3. Stoffliche Grundlage für das osmotische Verhalten normaler Zellen unter Licht- und Dunkelbedingungen

a) Analyse der Kationen in der Zelle

Die Veränderung des osmotischen Wertes der Zelle muß natürlich durch Zu- oder Abnahme der im Zellsaft gelösten Substanzen verursacht werden. Die chemische Analyse des Zellsaftes von *Nitella clavata* (Hoagland und Davis 1923) und von anderen Characeen (Collander 1936) zeigt, daß in der Vacuole hauptsächlich anorganische Ionen und darunter K-, Na-, Ca-, Mg- und Cl-Ion besonders reichlich vorhanden sind.

Tab. 6 zeigt für unser Material die Menge der Kationen (K^+ , Na^+ , Ca^{++}) in der Zelle, und zwar einmal in mM-Äquiv. und zum anderen auch in ihrer osmotischen Konzentration als Salze in mol, immer unter der Annahme, daß als Anion Cl^- zumindest in überwiegender Menge vorhanden ist. Aus den Zahlenangaben geht hervor, daß auch bei *Nitella flexilis* das Hauptkation K^+ ist und daneben Na^+ und Ca^{++} in ungefähr gleicher Menge auftreten. Genauer betrachtet, ergibt sich weiter folgende Regel: Wenn K^+ verhältnismäßig reichlich vorhanden ist, dann ist Na^+ und Ca^{++} nur in geringer Menge nachweisbar, und umgekehrt. Beachtenswert ist, daß die Summe der osmotischen Konzentrationen der Ionen ($C_{\text{K}+\text{Na}+\text{Ca}}$) mit dem osmotischen Wert der Zelle (C_0) ziemlich gut übereinstimmt. Das könnte dahingehend interpretiert werden, daß die osmotisch aktiven Substanzen im Zellsaft meistens Elektrolyten wie K-, Na- und Ca-Salze sind.

Da wir zur Kationenanalyse nicht nur den Zellsaft, sondern die ganze Zelle (Protoplasma + Zellsaft) heranzogen, zeigen die in Tab. 6 angegebenen Kationenkonzentrationen nicht ohne weiteres diejenigen des Zellsaftes. Die richtigen Konzentrationen liegen höher oder niedriger je nachdem, ob das Plasma mehr oder weniger Kationen enthält als die Vakuole. Obwohl

einige Autoren feststellen (Holm-Jensen, Krogh und Wartiovaara 1944, MacRobbie und Dainty 1958), daß die Ionen in Plasma und Vakuole gleich konzentriert vorkommen, sind unsere Kenntnisse von den ionaren Verhältnissen im Pflanzenplasma noch lückenhaft. Dennoch sollen die Kationenkonzentrationen in Tab. 6 im großen und ganzen als diejenigen der Vakuole betrachtet werden, da diese etwa 85 bis 90% des Zellvolumens einnimmt und damit der Fehler durch plasmatische Ionen als gering erachtet wird und vernachlässigt werden kann.

Tab. 6. Kationen-Konzentration in den Zellen von *Nitella flexilis*.

I_K , I_{Na} , I_{Ca} : Konzentration von K^+ , Na^+ und Ca^{++} in der Zelle, angegeben in mM-Äquiv. C_K , C_{Na} , C_{Ca} : Osmotische Konzentration (Zuckeräquivalent) von K-, Na- und Ca-Salzen in der Zelle, wenn diese Kationen mit Cl ein Paar bilden, angegeben in mol $C_K + Na + Ca = C_K + C_{Na} + C_{Ca}$. C_O : Osmotischer Wert der Zelle. D. S.: Durchschnittswert.

Zelle	K		Na		Ca		$C_{K+Na+Ca}$	C_O
	I_K	C_K	I_{Na}	C_{Na}	I_{Ca}	C_{Ca}		
1	105,0	0,191	15,6	0,028	20,4	0,053	0,272	0,282
2	78,6	0,143	18,9	0,034	34,0	0,111	0,288	0,296
3	99,5	0,181	32,2	0,058	24,3	0,063	0,302	0,284
4	110,4	0,201	31,1	0,056	18,1	0,047	0,304	0,285
5	96,8	0,176	26,6	0,048	14,7	0,038	0,262	0,285
6	146,1	0,266	4,5	0,008	14,3	0,037	0,311	0,289
7	120,8	0,220	3,9	0,007	11,2	0,029	0,256	0,268
8	107,1	0,195	13,3	0,021	11,5	0,030	0,246	0,270
9	105,5	0,192	16,1	0,029	11,2	0,029	0,250	0,277
10	128,5	0,234	1,7	0,003	8,9	0,023	0,260	0,276
11	128,5	0,234	1,1	0,002	8,5	0,022	0,258	0,277
12	134,6	0,245	8,9	0,016	12,7	0,033	0,294	0,280
D. S.	114,3	0,207	14,5	0,026	16,6	0,043	0,275	0,280

b) Anteilnahme der Ionen an der Veränderung des osmotischen Wertes der Zelle

Weiter war zu prüfen, welchen Anteil die Ionen quantitativ an der Veränderung des osmotischen Wertes der Zelle unter verschiedenen Bedingungen haben. Als Versuchslösungen kamen hierbei entionisiertes Wasser und Salzlösungen von 10^{-4} mol KCl, NaCl und $CaCl_2$ zur Verwendung. Die Versuchsdauer betrug bei Dunkelversuchen 7 Tage und bei Lichtversuchen 3 bis 4 Tage. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 dargestellt.

Unter Dunkelbedingungen nimmt der osmotische Wert in allen Versuchslösungen ab. In ionenfreiem Wasser werden alle Kationen in unterschiedlicher Menge von der Zelle in die Außenlösung abgeschieden; hierbei ist K^+ am stärksten vertreten. Das K-Salz ist daher für die Verminderung des osmotischen Wertes im wesentlichen verantwortlich. Ferner könnte die Tat-

sache, daß die Abnahme des osmotischen Wertes durch die Ionenabgabe ($\Delta C_{K+Na+Ca}$) größer als die Abnahme des osmotischen Wertes (ΔC_o) ist, darauf hindeuten, daß das Plasma mehr Ionen verliert als die Vakuole.

In Salzlösungen wird die Abnahme des osmotischen Wertes geringer als in ionenfreiem Wasser. Gleichzeitig werden weniger Ionen ausgeschieden, und manchmal sogar Ionen aus den KCl- und NaCl-Lösungen aufgenommen. Wir können also feststellen, daß die Hemmung der Ionenabnahme bzw. die Ionenaufnahme immer von den sich in der Außenlösung befindlichen Ionen abhängt. Die Abnahme des osmotischen Wertes unserer *Nitella*-Zellen in Salzlösungen ist daher nur mit der Abgabe von Ionen aus der Zelle erklärbar, die sich nicht in der Außenlösung befinden.

Die aus diesen niedrig konzentrierten Salzlösungen gewonnenen Ergebnisse ermöglichen uns eine Deutung des Befundes, nach welchem der osmotische Wert der Zelle in hochkonzentrierter Salzlösung beinahe konstant blieb oder etwas zunahm (vgl. Tab. 5), und weiter nach welchem der einmal in entionisiertem Wasser im Dunkeln verringerte osmotische Wert in Salzlösung wieder anstieg (vgl. Abb. 7). Es ist zu erwarten, daß aus einer 10^{-3} mol. oder 10^{-2} mol. KCl-Lösung mehr K^+ aufgenommen wird als aus einer 10^{-4} mol. KCl-Lösung, während andere Kationen wie Na^+ oder Ca^{++} in gleicher Menge wie in ionenfreiem Wasser abgegeben werden. Bei 10^{-3} mol wird vielleicht gerade so viel K^+ aufgenommen, daß die Zunahme des osmotischen Wertes durch die K^+ -Aufnahme die Abnahme des osmotischen Wertes durch Abgabe der anderen Kationen kompensiert. Bei 10^{-2} mol wird vielleicht mehr K^+ aufgenommen, während die Exosmose der anderen Kationen unverändert erfolgt. Daraus ergibt sich die Zunahme des osmotischen Wertes der Zelle.

Bei der Dunkelzunahme handelt es sich um den gleichen Vorgang. Die sich relativ lange in ionenfreiem Wasser befindende Zelle verliert viel K^+ . In konzentrierter KCl-Lösung nimmt sie dagegen schnell K^+ auf, womit die schnelle Zunahme des osmotischen Wertes erklärbar ist (Abb. 7 a, b). Die schwache Dunkelzunahme in konzentrierter NaCl-Lösung (Abb. 7 c) erklärt sich dadurch, daß der den osmotischen Wert erhöhende Effekt der Na^+ -Aufnahme zum Teil durch den den osmotischen Wert erniedrigenden Effekt der K^+ -Abgabe kompensiert wird, die in NaCl-Lösung genau so stark wie in ionenfreiem Wasser abläuft.

Betreffs des osmotischen Einflusses bildet Ca^{++} einen deutlichen Gegensatz zu K^+ und Na^+ . Der Konzentrationseffekt ist im Dunkeln kaum zu bemerken (Abb. 2 c), und außerdem findet keine Dunkelzunahme des osmotischen Wertes statt (Abb. 7 d). Dies ist sehr wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß Ca^{++} im Vergleich mit K^+ oder Na^+ nur schwer in die Zelle permeieren kann.

Unter Lichtbedingungen wird im allgemeinen die Exosmose der Kationen geringer. In entionisiertem Wasser ist die Abgabe von K^+ durch Belichtung stark reduziert, während diejenige von Na^+ und Ca^{++} genau so erfolgt wie im Dunkeln. Sehr merkwürdig ist, daß einige Zellen (Zelle 8, 9; Tab. 7) Ionen abgeben und dennoch ihre osmotischen Werte erhöhen. Bei anderen Zellen (Zelle 6, 7, 10) ist die Abnahme des osmotischen Wertes durch Ionen-

Tab. 7. Anteil der Ionen an der Veränderung des osmotischen Wertes der Nitella-Zelle unter Licht- und Dunkelbedingungen.

ΔC_0 : Veränderung des osmotischen Wertes der Zelle in M. ΔC_K , ΔC_{Na} , ΔC_{Ca} : Vermutliche Veränderungen des osmotischen Wertes durch Zu- oder Abnahme der Konzentration von K-, Na- und Ca-Chlorid in der Zelle. $\Delta C_{K+Na+Ca} = \Delta C_K + \Delta C_{Na} + \Delta C_{Ca}$. +, -: Zu- oder Abnahme des osmotischen Wertes.

Zelle	Lösung	Bedingung	ΔC_K	ΔC_{Na}	ΔC_{Ca}	$\Delta C_{K+Na+Ca}$	ΔC_0
1	H ₂ O	Dunkel	- 0,028	- 0,001	- 0,010	- 0,039	- 0,027
2			- 0,037	- 0,001	- 0,008	- 0,046	- 0,038
3			- 0,011	0	-	-	- 0,026
4			- 0,015	0	- 0,012	- 0,027	- 0,026
5			- 0,022	- 0,001	- 0,007	- 0,030	- 0,026
6	H ₂ O	Licht	- 0,005	- 0,002	- 0,001	- 0,008	- 0,005
7			- 0,008	- 0,029	- 0,003	- 0,040	- 0,001
8			0	- 0,001	- 0,006	- 0,007	+ 0,002
9			0	- 0,004	- 0,001	- 0,001	+ 0,003
10			- 0,003	- 0,006	-	-	- 0,006
K ₁	10 ⁻⁴ mol KCl	Dunkel	- 0,005	- 0,001	- 0,004	- 0,010	- 0,010
K ₂			+ 0,007	- 0,003	- 0,014	- 0,007	- 0,015
K ₃			0	- 0,006	-	-	- 0,020
K ₄	10 ⁻⁴ mol KCl	Licht	+ 0,043	- 0,002	- 0,029	+ 0,012	+ 0,024
K ₅			+ 0,031	- 0,002	- 0,006	+ 0,023	+ 0,010
K ₆			+ 0,022	- 0,003	- 0,002	+ 0,003	+ 0,010
K ₇			+ 0,027	- 0,004	+ 0,002 ¹	+ 0,025	+ 0,014
K ₈			+ 0,025	- 0,003	+ 0,002 ¹	+ 0,024	+ 0,018
K ₉			+ 0,015	- 0,004	- 0,005	+ 0,006	+ 0,020
K ₁₀			+ 0,034	- 0,002	+ 0,002 ¹	+ 0,034	+ 0,040
Na ₁	10 ⁻⁴ mol NaCl	Dunkel	- 0,016	+ 0,004	- 0,012	- 0,024	- 0,016
Na ₂			- 0,008	+ 0,002	-	-	- 0,020
Na ₃			- 0,015	+ 0,001	- 0,013	- 0,027	- 0,021
Na ₄	10 ⁻⁴ mol NaCl	Licht	+ 0,001 ¹	+ 0,005	- 0,001	+ 0,005	+ 0,001
Na ₅			+ 0,002 ¹	+ 0,009	- 0,007	+ 0,004	+ 0,010
Na ₆			+ 0,001 ¹	+ 0,009	-	-	+ 0,003
Na ₇			+ 0,002 ¹	+ 0,012	0	+ 0,014	+ 0,003
Na ₈			+ 0,001 ¹	+ 0,010	- 0,001	+ 0,010	+ 0,020
Na ₉			+ 0,004 ¹	+ 0,009	- 0,001	+ 0,012	+ 0,010

¹ Die einfachen Salzlösungen konnten von anderen Ionen nicht ganz freigehalten werden, weil der Glastubus auch nach mehrmaligem Abspülen mit entionisiertem Wasser doch noch Ionen in die Außenlösung abgab. Die Konzentration solcher Ionen in der Außenlösung betrug aber höchstens $1-3 \times 10^{-6}$ mol für K⁺, $2-5 \times 10^{-6}$ mol für Na⁺ und 10^{-3} mol für Ca⁺⁺.

Zelle	Lösung	Bedingung	ΔC_K	ΔC_{Na}	ΔC_{Ca}	$\Delta C_{K+Na+Ca}$	ΔC_O
Ca ₁	10 ⁻⁴ mol CaCl ₂	Dunkel	- 0,002	- 0,002	-	-	- 0,019
Ca ₂			- 0,008	- 0,002	0	- 0,010	- 0,020
Ca ₃			- 0,007	- 0,005	- 0,008	- 0,020	- 0,021
Ca ₄	10 ⁻⁴ mol CaCl ₂	Licht	- 0,002	0	- 0,007	- 0,009	+ 0,002
Ca ₅			- 0,004	- 0,005	- 0,002	- 0,011	- 0,018
Ca ₆			- 0,006	- 0,006	- 0,002	- 0,014	- 0,014
Ca ₇			- 0,006	- 0,006	+ 0,008	- 0,004	- 0,010
Ca ₈			- 0,002	- 0,005	+ 0,006	- 0,001	- 0,005

abgabe ($\Delta C_{K+Na+Ca}$) größer als die Abnahme des gemessenen osmotischen Wertes (ΔC_O). Diese Tatsachen bedeuten, daß das Plasma mehr Ionen an die Außenlösung verliert als die Vakuole und gelegentlich sogar Ionen in die Vakuole ausscheiden kann.

In Salzlösungen wird der Lichteffect noch deutlicher. Z. B. nimmt in 10⁻⁴ mol. KCl-Lösung der osmotische Wert durch Belichtung zu und gleichzeitig wird mehr K⁺ aufgenommen als im Dunkeln. Demnach ist die K⁺-Aufnahme für die Zunahme des osmotischen Wertes verantwortlich. Die Abhängigkeit der Lichtzunahme von der Salzkonzentration (Abb. 2 a) könnte auch auf die verstärkte K⁺-Aufnahme bei zunehmender Konzentration zurückgeführt werden.

Bei der Lichtzunahme des osmotischen Wertes in 10⁻⁴ mol. NaCl-Lösung müssen zwei Faktoren berücksichtigt werden; erstens die verminderte K⁺-Exosmose und zweitens die Na⁺-Aufnahme. In höher konzentrierten NaCl-Lösungen wird sehr wahrscheinlich mehr Na⁺ aufgenommen, was die stärkere Zunahme des osmotischen Wertes erklärt.

In 10⁻⁴ mol. CaCl₂-Lösung verhält sich die Zelle wie in ionenfreiem Wasser. Die Lichtwirkung zeigt sich nur darin, daß die K⁺-Exosmose stark unterdrückt wird. Die in Abb. 2 c beobachtete Tatsache, daß die Lichtzunahme in CaCl₂-Lösungen bei allen Konzentrationen gleichbleibt, ließe sich dadurch erklären, daß Ca⁺⁺ auch im Licht sehr schwer von der Zelle aufgenommen wird.

Aus den Ergebnissen der Licht- und Dunkelversuche läßt sich schließen, daß die Veränderung des osmotischen Wertes der Zelle unter verschiedenen Bedingungen immer von entsprechenden Ionenbewegungen begleitet wird. Es ergibt sich weiter, daß die Ionen je nach ihrer Art sehr unterschiedlich an der Veränderung des osmotischen Wertes beteiligt sind. K⁺ zeigte sich am wirksamsten, während bei Ca⁺⁺ kaum ein Einfluß nachweisbar ist.

4. Bedeutung von Licht-Dunkel-Wechsel für die Osmoregulation der normalen Zelle

Bei der Einstellung eines bestimmten osmotischen Wertes können sich verschiedene Faktoren beteiligen. Wir haben gezeigt, daß wenigstens zwei äußere Bedingungen berücksichtigt werden müssen: 1. die Ionenkonzentration

tration bzw. Salzkonzentration der Außenlösung und 2. die Lichtintensität. Unter der Voraussetzung, daß alle anderen Faktoren konstant bleiben, läßt sich der osmotische Wert der *Nitella*-Zelle als Funktion dieser beiden Faktoren bestimmen. Also,

$$C_o = F(I, L),$$

wobei C_o , I und L den osmotischen Wert der Zelle, Ionenkonzentration der Außenlösung und Lichtintensität bedeutet. Die graphische Darstellung dieser Beziehung gibt uns Abb. 8. Die Abhängigkeit des osmotischen Wertes von der Lichtintensität bei 10^{-3} mol KCl haben wir schon in Abb. 3 gezeigt. Es bleibt natürlich offen, ob die gleiche Beziehung auch bei anderen KCl-Konzentrationen besteht. Da aber die den osmotischen Wert erhöhende

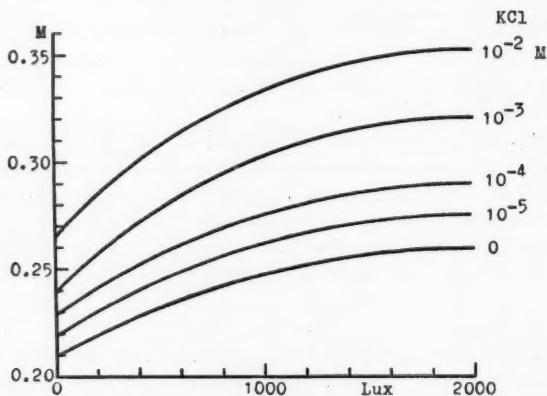
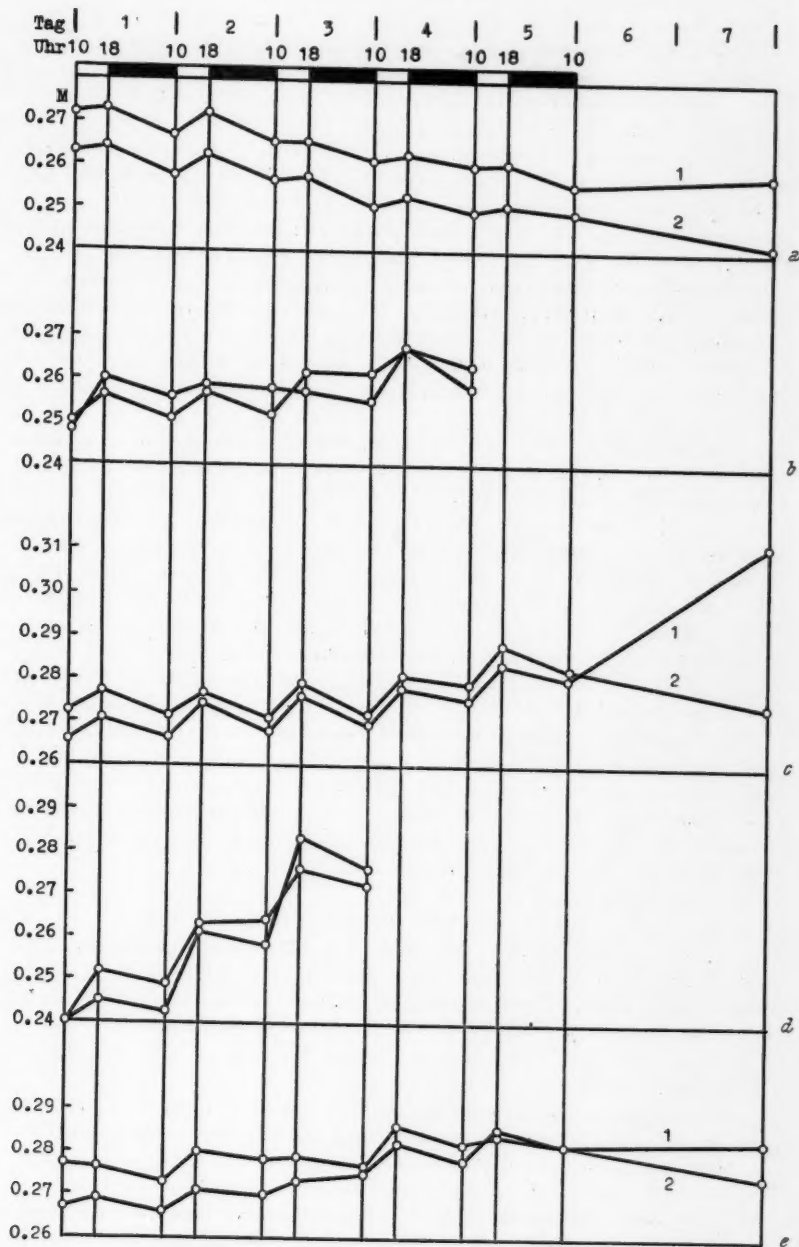


Abb. 8. Die Abhängigkeit des osmotischen Wertes der *Nitella*-Zelle von der Lichtintensität in verschiedenen konzentrierten KCl-Lösungen (halbschematisch).

Wirkung des Lichtes von der Ionenkonzentration abhängig ist (Abb. 2 a), können wir annehmen, daß die Kurven auch bei anderen Ionenkonzentrationen ähnlich wie bei 10^{-3} mol verlaufen würden.

Abb. 8 zeigt nun, daß der osmotische Wert der Zelle durch die KCl-Konzentration der Außenlösung und die Lichtintensität variiert werden kann. Nehmen wir an, daß eine Zelle mit einem osmotischen Wert von 0,25 mol in 10^{-4} mol. KCl-Lösung im Dunkeln kultiviert wird, dann sollte dem Schema nach ihr osmotischer Wert auf 0,23 mol abnehmen. Wenn sie aber dem Licht von 2000 Lux ausgesetzt wird, müßte der osmotische Wert auf 0,29 mol steigen. Also schwankt der osmotische Wert in 10^{-4} mol. KCl-Lösung je nach der Lichtintensität im Bereich von 0,23 mol und 0,29 mol.

Abb. 9. Tagesperiodische Schwankungen des osmotischen Wertes der *Nitella*-Zelle in verschiedenen Versuchslösungen. Die Zelle wurde von 10 bis 18 Uhr belichtet. Die Nummer 1 oder 2 bei a, c und e bedeutet, daß die Zelle in den letzten zwei Tagen unter Licht- bzw. Dunkelbedingungen war. a: H_2O , b: 10^{-5} mol KCl, c: 10^{-4} mol KCl, d: 10^{-3} mol KCl, e: Nährlösung.



Bei NaCl können wir an ein grundsätzlich gleiches Schema denken, weil die bisherigen Ergebnisse zeigen, daß sich die Zelle in NaCl-Lösungen sehr ähnlich wie in KCl-Lösungen verhält. Für CaCl_2 müssen wir jedoch ein ganz anderes Bild entwerfen, da in CaCl_2 -Lösungen kein Konzentrations-effekt beobachtet wurde (Abb. 2 c).

Wir fragen nun, wie sich der osmotische Wert der Zelle bei Licht-Dunkel-Wechsel verhält. In der Natur wird die *Nitella*-Zelle dem Wechsel von Tag und Nacht ausgesetzt und ihr osmotischer Wert bleibt für lange Zeit ziemlich konstant. Unserem Schema nach sollte der osmotische Wert durch Belichtung, also bei Tag, steigen und durch Verdunkelung, also in der Nacht, sinken. Um dieser Vermutung nachzugehen, setzten wir Versuche bei künstlichem Licht-Dunkel-Wechsel in verschieden konzentrierten KCl-Lösungen an. Die Zellen wurden von 10 bis 18 Uhr mit Leuchtstoffröhren belichtet (2000 Lux), und während der übrigen 16 Stunden im Dunkeln gehalten. Die Bestimmung des osmotischen Wertes fand morgens um 10 Uhr und abends um 6 Uhr statt.

Abb. 9 zeigt deutlich, daß in allen Versuchslösungen der osmotische Wert bei Tag zu- und in der Nacht abnimmt. Also schwankt der osmotische Wert der Zelle entsprechend dem Licht-Dunkel-Wechsel. Ob aber der osmotische Wert im Laufe der Zeit im großen und ganzen konstant bleibt, scheint von der Ionenkonzentration abzuhängen. In ionenfreiem Wasser nimmt er allmählich ab, in Lösungen mit niedriger Salzkonzentration (10^{-4} , 10^{-5} mol) bleibt er fast konstant und in Lösungen mit hoher Konzentration (10^{-3} mol) nimmt er stark zu. Hierbei muß natürlich auch die Lichtintensität und die Dauer der Belichtung bzw. der Verdunkelung berücksichtigt werden. Im Extremfall, also im Dauerlicht, nimmt der osmotische Wert nur zu und im Dauerdunkel ab (Abb. 9 a, c, e). So steigt in Abb. 9 c der osmotische Wert der Zelle 1 nach zweitägiger Dauerbelichtung von 0,28 mol auf 0,311 mol, während der osmotische Wert der Zelle 2 nach zweitägiger Dauerverdunklung von 0,282 mol bis auf 0,274 mol abnimmt. Unter dem Einfluß des Licht-Dunkel-Wechsels würde dann der osmotische Wert im Bereiche dieser beiden Werte schwanken. In der Nährlösung der Stammkultur (vgl. Tab. 1) konnte eine ähnliche tagesperiodische Schwankung des osmotischen Wertes beobachtet werden (Abb. 9 e).

Aus den Ergebnissen geht klar hervor, daß für Einhaltung eines bestimmten osmotischen Wertes der Zelle unter den natürlichen Bedingungen des Wechsels von Tag und Nacht die Ionenkonzentration des Kulturmediums entscheidend wichtig ist. Wenn wir unter Osmoregulation die Einhaltung eines bestimmten osmotischen Wertes verstehen, dann können wir folgern, daß diese der Zelle eine tagesperiodische Schwankung des osmotischen Wertes unterstellt.

Die tagesperiodische Schwankung des osmotischen Wertes muß auf Grund der Veränderung der Ionenkonzentration, hier hauptsächlich der K^+ -Konzentration in der Vakuole, erklärt werden. In KCl-Lösungen wird K^+ im Licht von der Zelle aufgenommen und im Dunkeln umgekehrt aus der Zelle ausgeschieden (vgl. Tab. 7). Sicher schwankt daher mit dem Licht-Dunkel-Wechsel auch die Menge von K^+ in der Vakuole, was dann für die

tagesperiodische Veränderung des osmotischen Wertes verantwortlich sein kann. In ionenfreiem Wasser müssen aber die Verhältnisse etwas anders sein. Während der Lichtphase werden die Ionen des Plasmas nicht nur in die Außenlösung, sondern auch in die Vacuole ausgeschieden; das erklärt die beobachtete Erhöhung des osmotischen Wertes. Während der Dunkelphase werden jedoch die Ionen vom Plasma und der Vakuole in die Außenlösung abgegeben, was die Abnahme des osmotischen Wertes zur Folge haben kann. Daß die Zelle während der Lichtperiode die im Verlauf der Dunkelperiode abgeschiedenen Ionen wieder aufnimmt, wurde durch tägliches Wechseln des entionisierten Wassers zu Beginn der Lichtperiode ausgeschlossen.

III. Osmotisches Verhalten der behandelten Zellen

Kamiya und Kuroda (1956) beschrieben schon die Grundzüge der Osmoregulation der *Nitella*-Zelle, deren osmotischer Wert künstlich modifiziert wurde. Es zeigt die Zelle in $\frac{1}{100}$ verdünnter Knopscher Nährlösung bei natürlichem Diffuslicht die Tendenz, ihren normalen osmotischen Wert zu regenerieren, einerlei, ob der künstlich erzeugte osmotische Wert höher oder niedriger als der Normalwert ist. Es schien uns wünschenswert, den Vorgang der Osmoregulation unter konstanten und einfacheren Bedingungen zu untersuchen. In dieser Absicht wurde in vorstehenden Versuchen als Außenlösung ionenfreies Wasser und KCl-Lösungen verschiedener Konzentrationen verwendet. Die Lichtintensität betrug 2000 Lux oder Null (Dunkelheit). Die sonstigen Versuchsbedingungen entsprachen den im vorigen Abschnitt geschilderten.

Der Einfachheit halber nennen wir die nach Kamiya und Kuroda präparierte Zelle mit abnormem osmotischem Wert „behandelte Zelle“ und die Ausgangszelle „normale Zelle“. Von den zweierlei behandelten Zellen bezeichnen wir die mit erniedrigtem osmotischem Wert als „L-Zelle“ und die andere mit erhöhtem osmotischem Wert als „H-Zelle“. In den Figuren wird eine zur Abszisse parallele Linie gezeichnet, die den osmotischen Wert der normalen Zelle angibt.

1. Osmoregulation der L-Zelle

a) Dunkelversuche

Abb. 10 zeigt, wie sich die Zellen mit niedrigerem osmotischem Wert, also die L-Zellen, unter Dunkelbedingungen in verschieden konzentrierten KCl-Lösungen verhalten. In Abb. 10 a hat Zelle 1 einen osmotischen Wert von 0,165 mol, der um 0,118 mol geringer ist als derjenige der normalen Zelle. In 10^{-3} mol. KCl-Lösung kann die Zelle ihren osmotischen Wert nicht konstant erhalten, während dies bei der normalen Zelle der Fall ist (vgl. Abb. 1). Der osmotische Wert nimmt sofort und konstant zu, und in einer Woche erreicht er fast den osmotischen Wert der normalen Zelle. In 10^{-4} mol. KCl-Lösung geht die Wiederherstellung des osmotischen Wertes viel langsamer vor sich als in 10^{-3} mol. KCl-Lösung (Abb. 10 b). Nach einer Woche bleibt der osmotische Wert noch weit unter dem Normalwert. Also auch

hier sehen wir einen deutlichen Effekt der Salzkonzentration ganz wie bei normalen Zellen. Dieser Effekt ist in Abb. 10 c am deutlichsten zu beobachten: In ionenfreiem Wasser nimmt der osmotische Wert kaum zu.

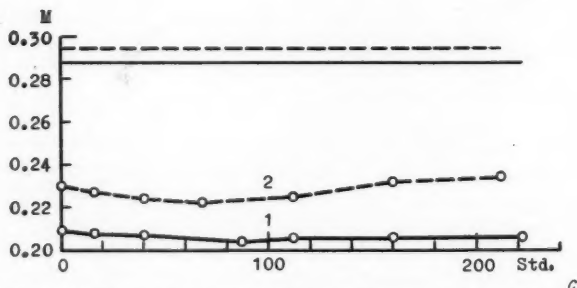
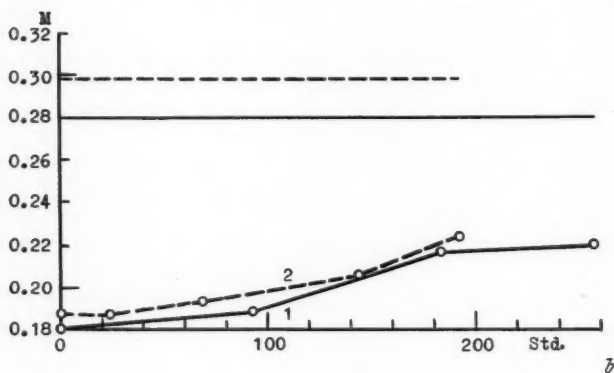
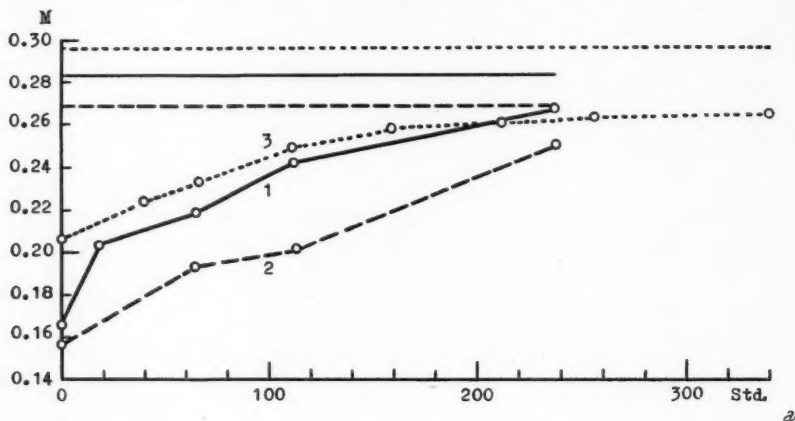


Abb. 10. Die zeitliche Veränderung des osmotischen Wertes der L-Zelle unter Dunkelbedingungen. a: 10^{-3} mol KCl, b: 10^{-4} mol KCl, c: H_2O .

b) Lichtversuche

Abb. 11 zeigt, wie sich die L-Zelle bei einer Lichtintensität von 2000 Lux in verschiedenen konzentrierten KCl-Lösungen verhält. In 10^{-3} mol. KCl-Lösung erhöht sich der osmotische Wert viel schneller als im Dunkeln (vgl. Abb. 10 a und Abb. 11 a). Schon nach drei Tagen erreicht er den Wert der normalen Zelle und steigt dann weit darüber hinauf. Die den osmotischen Wert erhöhende Wirkung des Lichtes kommt also auch bei L-Zellen genau wie bei normalen Zellen sehr deutlich zum Ausdruck. In 10^{-4} mol. KCl-Lösung wird diese Wirkung schwächer (Abb. 11 b). Aber im Vergleich mit Abb. 10 b ist sie doch deutlich zu bemerken. Auch in entionisiertem Wasser steigt der osmotische Wert geringfügig an (Abb. 11 c).

Zusammen mit den Ergebnissen der Dunkelversuche sprechen nun auch die oben dargestellten Resultate der Lichtversuche für das im vorigen Abschnitt entworfene Schema von Abb. 8; dieses besagte, daß die Zelle unter bestimmten Licht- und Ionenbedingungen einen entsprechenden osmotischen Wert besitzt. In 10^{-3} mol. KCl-Lösung muß dem Schema nach die Zelle im Dunkeln einen osmotischen Wert von 0,24 mol und bei einer Belichtung mit 2000 Lux den höheren Wert von 0,32 mol haben. Tatsächlich verhielt sich die L-Zelle unter den beiden Lichtbedingungen so, als wollte sie diese Werte erreichen. Zusammenfassend können wir sagen, daß sich die Zelle, deren osmotischer Wert künstlich erniedrigt wurde, im wesentlichen so verhält wie die normale Zelle. Die Wiederherstellung des osmotischen Wertes ist also nichts anderes als die Erhaltung des Niveaus, das von den Kulturbedingungen bestimmt wird.

Die stoffliche Grundlage für die Regenerierung des osmotischen Wertes der L-Zelle liefert der bei normalen Zellen gewonnene Befund, daß die Veränderung des osmotischen Wertes stets von entsprechenden Ionenbewegungen begleitet wird (vgl. Tab. 7). Es liegt daher die Vermutung nahe, daß für die Zunahme des osmotischen Wertes der L-Zelle die Aufnahme von KCl verantwortlich ist. Der Befund, daß die Wiederherstellung des osmotischen Wertes mit zunehmender KCl-Konzentration und durch Belichtung beschleunigt wird, stützt diese Vermutung.

Die Frage, ob noch andere Salze wie NaCl oder CaCl_2 zur Wiederherstellung des osmotischen Wertes der L-Zelle fähig sind, bleibt noch offen.

2. Osmoregulation der H-Zelle

a) Dunkelversuche

In Abb. 12 a hat Zelle 1 anfangs einen osmotischen Wert von 0,332 mol, der um 0,064 mol höher als der Normalwert (0,268 mol) ist. Wird sie nun in 10^{-3} mol. KCl-Lösung unter Dunkelbedingungen kultiviert, dann nimmt ihr osmotischer Wert plötzlich ab. Schon nach einem Tag erreicht er den Normalwert und nach der Erreichung eines Minimums (0,260 mol) erhöht er sich wieder. Es gibt aber auch Zellen, die sich anders als Zelle 1 verhalten. Bei Zelle 2 oder 3 nimmt der osmotische Wert am ersten Tag etwas ab und danach verändert er sich nur noch sehr wenig oder gar nicht. Er bleibt also weit über dem Normalwert. Bei anderen Salzkonzentrationen finden wir

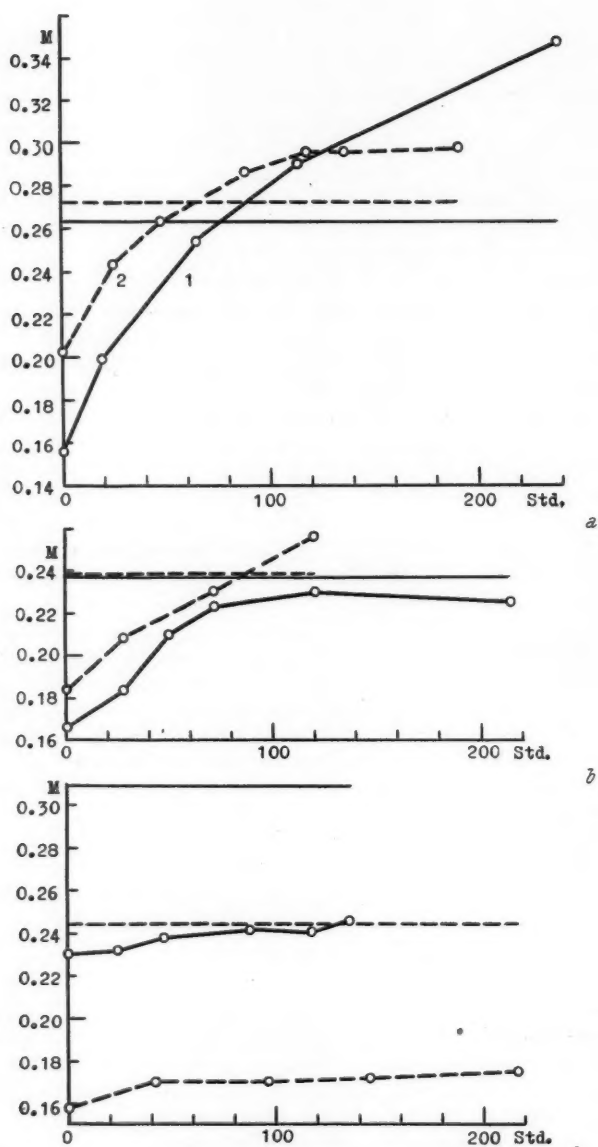


Abb. 11. Die zeitliche Veränderung des osmotischen Wertes der L-Zelle unter Lichtbedingungen. a: 10^{-3} mol KCl, b: 10^{-4} mol KCl, c: H_2O .

ebenfalls zwei Kurventypen, die durch die unterschiedliche Geschwindigkeit der Regeneration des normalen osmotischen Wertes charakterisiert sind.

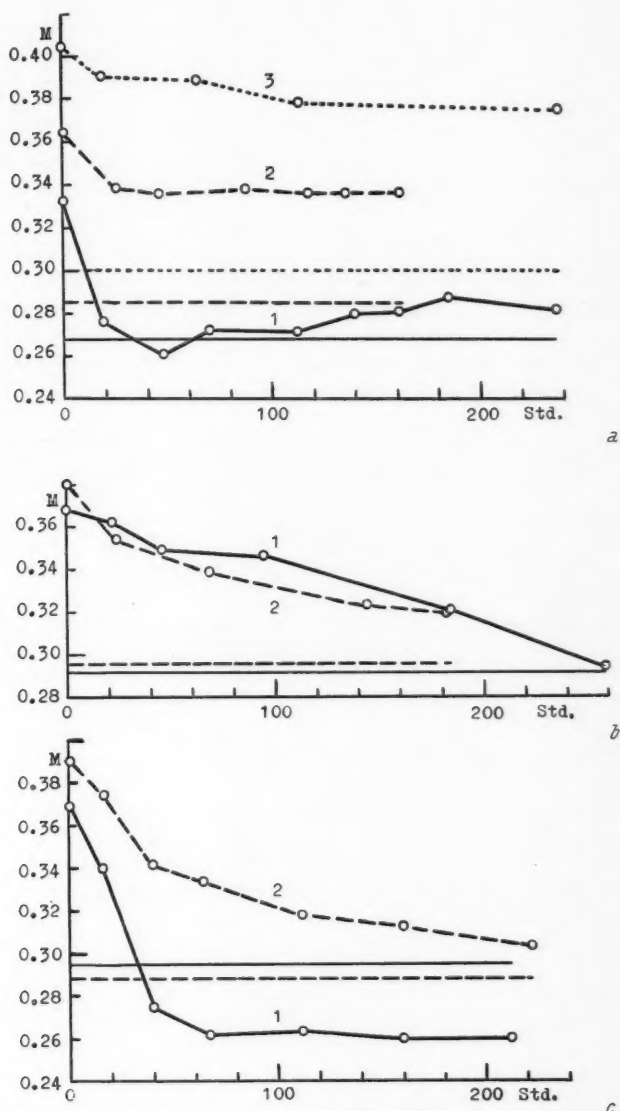


Abb. 12. Die zeitliche Veränderung des osmotischen Wertes der H-Zelle unter Dunkelbedingungen. a: 10^{-3} mol KCl, b: 10^{-4} mol KCl, c: H_2O .

Der bei L-Zellen gefundene Konzentrationseffekt ist hier kaum zu finden. Es besteht jedoch ein kleiner Unterschied zwischen der Zelle in 10^{-3} mol. KCl-Lösung und der in entionisiertem Wasser. Diese erniedrigt nämlich ihren osmotischen Wert schon in 3 Tagen derart, daß er erst weit unter dem Normalwert konstant wird (Abb. 12 c). Jene Zelle (Abb. 12 a, Zelle 1) zeigt dagegen einen deutlichen Wiederanstieg des einmal erniedrigten osmotischen Wertes. Es ergibt sich weiter, daß nach der langen Versuchsdauer von etwa 200 Stunden der osmotische Wert der Zelle in stärker konzentrierter KCl-Lösung bedeutend höher bleibt als in niedrig konzentrierter oder in entionisiertem Wasser, was für das Schema von Abb. 8 spricht.

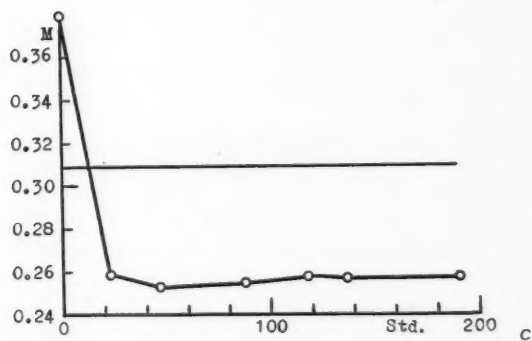
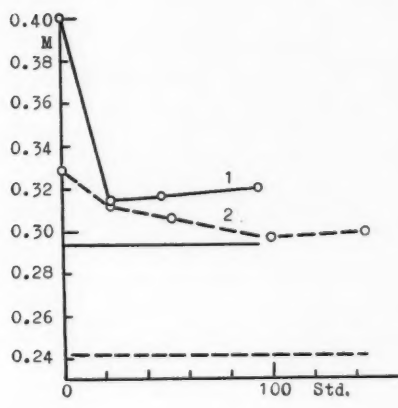
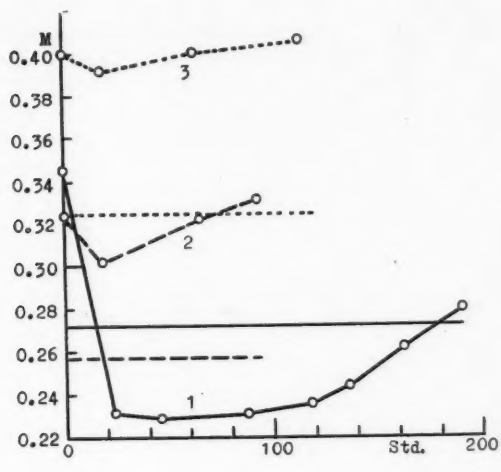
b) Lichtversuche

Im Licht verhalten sich die Zellen ganz ähnlich wie im Dunkeln. Hier sind ebenfalls zwei unterschiedliche Kurvenverläufe bemerkbar. Bei einem Teil der Zellen nimmt der osmotische Wert schon nach einem Tag sehr stark ab (Abb. 13 a 1, b 1, c), während er bei den anderen Zellen nur geringfügig zurückgeht (Abb. 13 a 2, 3). Merkwürdig ist aber, daß sich der anfangs einmal erniedrigte osmotische Wert in KCl-Lösungen wieder erhöht. Bei 10^{-3} mol geht die Erhöhung manchmal so weit, daß er bald den osmotischen Wert zu Versuchsbeginn überschreitet. Die Dunkelversuche zeigten schon, daß die Wiederherstellung des normalen osmotischen Wertes in hochkonzentrierter KCl-Lösung unvollständig ist. Das Licht stört dann diesen Vorgang oder kehrt ihn sogar um. Diese Tatsache erinnert uns an den wiederholt festgestellten Lichteffect, wonach das Licht das Niveau des osmotischen Wertes erhöht.

Aus den Ergebnissen von Licht- und Dunkelversuchen können wir schließen, daß die Osmoregulation bei H-Zellen wesentlich anders abläuft als bei L-Zellen. Möglicherweise ist bei L-Zellen nur ein Prozeß tätig, der durch die Ionenkonzentration der Außenlösung und die Lichtintensität bedingt wird. Bei H-Zellen muß aber dazu noch ein anderer Vorgang berücksichtigt werden, der durch die anfänglich rasche Abnahme des osmotischen Wertes veranschaulicht wird und merkwürdigerweise von Ionenkonzentration und Lichtintensität unabhängig zu sein scheint. Die in Abb. 12 und 13 beobachteten Veränderungen der osmotischen Werte lassen sich durch die Kombinierung dieser beiden Prozesse gut verstehen. Im Licht wie im Dunkeln ist während etwa eines Tages der Prozeß vorwiegend, der zur steilen Abnahme des osmotischen Wertes führt und von Außenbedingungen unabhängig ist; danach wird der andere Prozeß wirksam, der von Außenbedingungen abhängig ist.

Es fragt sich nun, was für ein Faktor für diese steile Abnahme des osmotischen Wertes verantwortlich sein kann. Wir vermuten, daß es sich hierbei um einen veränderten Plasmazustand der H-Zelle handelt. Die plötzliche Anhäufung des Vakuoleninhaltes und der rasche Austritt des Wassers, die bei der Herstellung der H-Zelle unvermeidlich sind, könnten

Abb. 13. Die zeitliche Veränderung des osmotischen Wertes der H-Zelle unter Lichtbedingungen. a: 10^{-3} mol KCl, b: 10^{-4} mol KCl, c: H_2O .



eine Veränderung des Plasmazustandes bzw. seiner physiologischen Aktivität verursachen. In dieser Hinsicht ist der Befund von Nishizaki (1955) von großem Interesse. Er beobachtete, daß bei H-Zellen das Membranpotential in 10^{-4} mol. KCl-Lösung von etwa 130 mV auf etwa 70 mV abnahm, während es bei L-Zellen fast unverändert blieb. Der Autor dachte hier an eine Verminderung der Beweglichkeit des K-Ions zum Cl-Ion bei den H-Zellen. Obwohl für diese Vermutung kein direkter Beweis vorliegt, handelt es sich hierbei sicher um eine Veränderung der Membraneigenschaft bzw. des Plasmazustandes der Zelle. Um klarzustellen, wie die Abnahme des Membranpotentials mit der Abnahme des osmotischen Wertes der H-Zelle zusammenhängt, führte Nagai (1959) den entsprechenden Versuch durch. Die Autorin bestätigte aufs neue die starke Abnahme des Membranpotentials an H-Zellen und darüber hinaus, daß das einmal verminderte Membranpotential schon nach zwei Tagen den normalen Wert wieder erreicht hatte. Unter Berücksichtigung der Bedeutung des Membranpotentials für die Ionenbewegung (vgl. Ussing 1949, Teorell 1949) schloß sie, daß nicht nur die Zunahme der Ionenkonzentration im Zellsaft, sondern auch die Abnahme des Membranpotentials die nach außen gerichtete Ionenbewegung verstärkt. Dies kann natürlich die Ausscheidung der Ionen aus der Zelle und folglich die Abnahme des osmotischen Wertes verursachen. Mit der Wiederherstellung des normalen Membranpotentials nach zwei Tagen vermindert sich gleichzeitig die Tendenz zur Ionenausscheidung. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß die anfänglich schnelle Verminderung des osmotischen Wertes bei H-Zellen mit der plötzlichen Abnahme des Membranpotentials in enger Beziehung steht. Um aber behaupten zu können, daß allein die Veränderung des „elektrochemischen Potentials“ für die Veränderung des osmotischen Wertes verantwortlich ist, sind weitere Untersuchungen nötig.

IV. Allgemeine Diskussion

Iwanami (1954a) fand, daß Keimung und Wachstum von Pollen erst unter der Mitwirkung der Osmoregulation möglich ist. Die Pollenkörner, die auf Agarböden mit verschiedenen Saccharosekonzentrationen (0,15 bis 0,8 mol) kultiviert wurden, konnten nur dann keimen, wenn ihr osmotischer Wert gleich oder etwas höher als die Konzentration des Zuckers im Nährboden war. Er vermutet (1954b), daß die Adaptation an die hohe Zuckerkonzentration des Mediums durch hydrolysierenden Stärkeabbau möglich ist. Die Osmoregulation bei diesem Material bedeutet also nicht die Einstellung eines bestimmten osmotischen Wertes, sondern die einer bestimmten Turgeszenz, die für das Wachstum eine Voraussetzung bedeutet. Daß die Osmoregulation der *Nitella*-Zelle von ganz anderer Natur sein dürfte, zeigt schon der Versuch von Kamiya und Kuroda (1956). Die behandelte Zelle mit erhöhtem osmotischem Wert (H-Zelle) konnte in der isotonischen Zuckerlösung ihren normalen osmotischen Wert wiederherstellen. Im Gegensatz zur Osmoregulation bei Pollen scheint es sich also hierbei um die Einhaltung eines bestimmten osmotischen Wertes zu handeln.

Nach Kamiya und Kuroda ist die Osmoregulation eine Funktion

der Zelle; sie hat den osmotischen Wert im normalen Nährmedium konstant zu halten oder ihn wieder herzustellen, falls er einmal verändert wurde. Andererseits zeigen unsere Versuche, daß der osmotische Wert der normalen Zelle nicht immer konstant bleibt, sondern vielmehr weitgehend von Außenbedingungen abhängig ist. Wenn wir die Definition von Kamiya und Kuroda akzeptieren, ist als Voraussetzung nötig, daß die Außenbedingungen vor und während des Versuches gleichförmig sind. Unter diesen Umständen scheint es zweckmäßig, den Begriff der Osmoregulation in einem erweiterten Sinne zu verstehen. Wir definieren sie nun folgendermaßen: Osmoregulation ist die Fähigkeit der Zelle, das den Außenbedingungen unterworfenen Niveau des osmotischen Wertes auf einer der Zelle gemäßen Höhe möglichst konstant einzuhalten. Damit wird auch verständlich, warum die behandelte Zelle je nach den Kulturbedingungen nicht immer vollkommen ihren anfänglichen osmotischen Wert wiederherstellt.

Über den Einfluß der Konzentration von Elektrolyten und Anelektrolyten im Nährmedium auf das Niveau des osmotischen Wertes ist seit Bächer (1920) viel gearbeitet worden (vgl. Blum 1958). Bächer fand, daß der osmotische Wert der *Elodea*-Blätter mit der Zunahme der Zuckerkonzentration in der Außenlösung ansteigt. Über eine sehr interessante Tatsache berichteten Bogen (1953, 1956) und Bogen und seine Mitarbeiter (1953, 1955): Danach nimmt der osmotische Wert von *Taraxacum* und *Melosira* in Saccharose- und anderen Anelektrolyt-Lösungen deutlich zu. Da diese Zunahme des osmotischen Wertes nicht von einer entsprechenden Akkumulation der Stoffe begleitet und durch den Zusatz von Na-Azid oder DNP stark gehemmt wird, suchen die Autoren den Grund für diese Erscheinung in einer mit dem Stoffwechsel gekoppelten nichtosmotischen Wasseraufnahme. Die von Bogen und seinen Mitarbeitern erzielten Resultate wurden von Höfler und Url (1958) mit anderem Material bestätigt. Sie interpretieren ihre Ergebnisse jedoch in anderer Weise. Sie vermuten, daß die Zunahme des osmotischen Wertes durch Zuckerpermeation verursacht wird und Stoffwechselgifte die Phosphorylierung des Zuckers blockieren. Wie aus Tab. 2 zu ersehen ist, konnten wir bei *Nitella* diesen Zuckereffekt nicht beobachten. Da aber die *Nitella*-Zelle in 0,2 mol Harnstoff oder Glycerin (zugesetzt zu 10^{-3} mol KCl) auch im Dunkeln ihren osmotischen Wert deutlich erhöht (in 2 Tagen 0,08 mol bei Harnstoff, 0,025 mol bis 0,03 mol bei Glycerin), muß das obige Ergebnis auf die Impermeabilität des Zuckers zurückgeführt werden.

Bei *Batrachium*-Arten beobachtete Gessner (1940) mit der Zunahme des Salzgehaltes im Außenmedium eine entsprechende Erhöhung des osmotischen Wertes. Auch bei *Nitella* wird der osmotische Wert stark von der Salzkonzentration der Außenlösung beeinflusst. Normalerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen der Ionenkonzentration des Zellsaftes und der Außenlösung. Wird aber die Ionenkonzentration der Außenlösung verändert, so bricht das Gleichgewicht zusammen und ein neuer Gleichgewichtszustand stellt sich ein. Dies könnte natürlich die Veränderung der Ionenkonzentration des Zellsaftes und folglich auch diejenige des osmotischen Wertes verursachen. Tab. 7 zeigt, daß die normale *Nitella*-Zelle ihr ionares

Gleichgewicht unter Dunkelbedingungen ungefähr mit einer Außenlösung von 10^{-4} einhalten kann.

Wird nun dagegen die Ionenkonzentration des Zellsaftes verändert, dann verschiebt sich natürlich das ionare Gleichgewicht. Dies ist dadurch bewiesen, daß die Zelle mit erniedrigtem osmotischem Wert in entionisiertem Wasser ihren osmotischen Wert fast unverändert beibehält (Abb. 10 c). Obwohl entionisiertes Wasser nicht völlig ionenfrei ist, bedeutet das Ergebnis immerhin, daß die *Nitella*-Zelle mit einer sehr niedrigen Ionenkonzentration der Außenlösung (1 bis 5×10^{-6} mol K und Na, 10^{-5} mol Ca; vgl. Tab. 7) das ionare Gleichgewicht halten kann. Wird eine solche Zelle in eine hochkonzentrierte Salzlösung (10^{-4} , 10^{-3} mol) übertragen, dann bricht das Gleichgewicht zusammen. Um mit der neuen Salzkonzentration in das Gleichgewicht zu kommen, nimmt die Zelle KCl auf und erhöht dadurch ihren osmotischen Wert. Die Osmoregulation bedeutet dann im Grunde genommen nichts anderes als das einmal zerstörte ionare Gleichgewicht zwischen Zellinnerem und Zelläußeren neu einzustellen.

Arisz (1956) fand bei *Vallisneria*-Blättern, daß ein niedriger Salzgehalt der Blätter die Chlorid-Aufnahme begünstigt. Aus einer Reihe von Versuchen mit *Vallisneria* entwickelte er die Vorstellung, nach welcher Chlorid im Dunkeln nur im Plasma gespeichert und erst unter Einwirkung des Lichtes in die Vakuole sezerniert wird. Unsere Versuche mit *Nitella* zeigen jedoch, daß die Speicherung der Ionen im Zellsaft auch im Dunkeln ziemlich schnell erfolgt (vgl. Abb. 7, 10).

Über die den osmotischen Wert der Zelle erhöhende Wirkung des Lichtes gibt es schon viele Arbeiten (Bäcker 1920, Beck 1935, Gessner 1940, Arisz 1956). Arisz beobachtete, daß sich der osmotische Wert der *Vallisneria*-Blätter durch Belichtung in 46 Stunden um 0,107 mol erhöht. Wie er vermutet, könnte dafür die Salzpermeation in die Vakuole hinein verantwortlich sein. Diese die Salzakkumulation fördernde Wirkung des Lichtes wurde auch an anderem Material viel untersucht, besonders ausführlich bei *Nitella clavata* (Hoagland und Davis 1924, 1929; Hoagland, Hibbard und Davis 1927) und bei anderen Characeen (Collander 1939). Hoagland und Davis (1929) konnten zeigen, daß das Kation (K^+) mit dem quantitativ gleichen Anion (Br^-) zusammen in der Zelle gespeichert wird. Bei *Nitella flexilis* wird die Erhöhung des osmotischen Wertes durch Belichtung auf die verstärkte Aufnahme von Salzen (KCl, NaCl) zurückgeführt. Wahrscheinlich beeinflusst das Licht das ionare Gleichgewicht zwischen Zellinnerem und -äußeren stark. Wenn die Salzkonzentration der Außenlösung konstant bleibt, liegt die Gleichgewichtskonzentration des Zellsaftes im Licht höher als im Dunkeln. Wenn man aber die Zellsaftkonzentration konstant halten will, dann genügt es, die Außenkonzentration im Licht niedriger einzustellen als im Dunkeln.

Noch nicht geklärt ist die Frage, ob das Licht das Gleichgewicht zwischen Außenlösung und Plasma, zwischen Plasma und Vakuole, oder gleichzeitig die beiden beeinflusst. Aus den Versuchen mit *Vallisneria* schließt Arisz (1948, 1953, 1954), daß sich Ionen im Dunkeln von der Vakuole zum Plasma (Symplasma) und bei Belichtung vom Plasma zur Vakuole bewegen. Unser

Befund, daß der osmotische Wert der *Nitella*-Zelle durch Belichtung auch in entionisiertem Wasser zunimmt, stützt diese Annahme stark. Er besagt aber noch nicht, daß in Salzlösungen Ionen zuerst vom Plasma in die Vakuole ausgeschieden und dann sekundär Ionen von der Außenlösung im Plasma aufgenommen werden. Um darüber die Entscheidung treffen zu können, bedarf es einer Technik, die es uns gleichzeitig ermöglicht, die Veränderung der Ionenkonzentration des Plasmas, des Zellsaftes und der Außenlösung zu messen.

Betreffs des Mechanismus der Lichtwirkung auf die Ionenaufnahme können wir mit mehreren Autoren (Ingold 1936, Luttkus und Botlicher 1939, van Adel, Arisz und Helder 1950, Helder 1952, van der Burg 1952, Scott und Hayward 1954) annehmen, daß hierbei die Photosynthese ein entscheidender Faktor ist. Es fehlt aber noch an Kenntnissen über die Beziehungen zwischen Photosynthese und Ionenaufnahme. Einen Ansatz zum Verständnis bietet der Befund von Scott und Hayward; danach wird die Photosynthese durch die Produktion der 3-Phosphoglyzerinsäure beeinflusst und durch einen damit zusammenhängenden Energiestoffwechsel in die Ionenbewegung eingegriffen. Es gibt aber auch Befunde, die gegen eine Beteiligung der Photosynthese sprechen. Aus der Tatsache, daß die Chlorid-Aufnahme der *Vallisneria*-Blätter bei Ausschluß von CO_2 unbeeinflusst bleibt, schließt Arisz (1947, 1948) auf einen direkten Einfluß des Lichtes auf den Protoplasten. Das Ergebnis eines Modellversuchs mit Pergamentpapier läßt L. und M. Brauner (1957) vermuten, daß ein direkter Einfluß des Lichts auf die Membran und folglich die Ionenpermeabilität besteht. Ob bei der *Nitella*-Zelle auch solche Photopermeabilitätsreaktion berücksichtigt werden muß, bleibt noch offen.

Im Zusammenhang mit der Lichtwirkung auf die Ionenaufnahme besteht noch ein anderes Problem. Wir haben nämlich beobachtet, daß normale und behandelte Zellen in Salzlösungen auch im Dunkeln ziemlich schnell ihren osmotischen Wert erhöhen, was wir auf die starke Ionenaufnahme zurückführten (vgl. Abb. 7, 10). Das Licht beschleunigt diesen Vorgang (vgl. Abb. 11). Es fragt sich nun, ob das Licht den gleichen Prozeß der Ionenaufnahme beeinflusst, der im Dunkeln abläuft, oder ob es etwa noch einen ganz anderen Prozeß der Ionenaufnahme gibt, der erst unter Aufwand von Lichtenergie in Gang gebracht wird. Die bis jetzt gewonnenen Ergebnisse geben uns darüber noch keinen Aufschluß.

Herrn Professor Dr. N. Kamiya danke ich herzlich für sein ständiges Interesse und für die Ratschläge bei dieser Arbeit. Herr Professor Dr. J. Kummerow in Santiago (Chile) war bei der Herstellung des Manuskripts behilflich.

Zusammenfassung

1. Die nach Kamiya und Kuroda hergestellten Zellhälften der Internodialzelle von *Nitella flexilis*, deren osmotischer Wert stark von dem osmotischen Wert normaler Zellen abweicht, können den normalen osmotischen Wert wieder einstellen. Um diese osmoregulatorische Funktion der

Zelle zu analysieren, wurde zuerst die normale Zellen auf ihr osmotisches Verhalten untersucht.

2. Der osmotische Wert der Zelle ist stark abhängig von der Lichtintensität und der Salzkonzentration der Außenlösung, aber unabhängig vom Turgor der Zelle.

3. Die Zunahme des osmotischen Wertes — Lichtzunahme — ist in KCl-Lösungen stärker als in NaCl-Lösungen. In CaCl_2 -Lösungen verhält sich die Zelle wie in ionenfreiem Wasser. Betreffs der Lichtzunahme ist CaCl_2 fast unwirksam.

4. Die Lichtzunahme hängt eng mit der photosynthetischen Aktivität der Zelle zusammen. Sie ist nicht von der Konzentration des Sauerstoffes, sondern von derjenigen der Kohlensäure in der Außenlösung abhängig.

5. Wie im Licht, so findet auch im Dunkeln eine merkliche Zunahme des osmotischen Wertes nur dann statt, wenn die Zelle lange in entionisiertem Wasser vorbehandelt und dann in konzentrierte Salzlösungen (10^{-3} , 10^{-2} mol) versetzt wird.

6. Im Licht-Dunkel-Wechsel schwankt der osmotische Wert der Zelle tagesperiodisch. Die Tatsache, daß der osmotische Wert unter natürlichen Bedingungen ungefähr konstant bleibt, erklärt sich dadurch, daß der am Tage erhöhte osmotische Wert in der Nacht wieder abnimmt.

7. Die Kationenanalyse der einzelnen Zelle zeigt, daß bei *Nitella flexilis* die osmotisch aktiven Stoffe meistens Elektrolyten wie K-, Na- und Ca-Salze sind. Obwohl die Gesamtmenge der Kationen bei allen Zellen ungefähr gleich ist, ist der Anteil des einzelnen Ions von Zelle zu Zelle ziemlich verschieden. Es ergibt sich aber im allgemeinen folgende Regel: wenn K^+ in großer Menge vorhanden ist, dann liegt Na^+ und Ca^{++} nur wenig vor und umgekehrt.

8. Es wurde bestätigt, daß die Veränderung des osmotischen Wertes immer von parallelen Ionenbewegungen begleitet wird, obwohl diese quantitativ nicht immer völlig mit jener übereinstimmt.

9. Die Zelle, deren osmotischer Wert nach Kamiya und Kuroda stark modifiziert wurde, zeigt ein im wesentlichen gleiches osmotisches Verhalten wie die normale Zelle.

10. Die Osmoregulation verstehen wir als eine Funktion der Zelle, die das den Außenbedingungen unterworfenen Niveau des osmotischen Wertes zu erhalten sucht oder es dann wiederzugewinnen trachtet, wenn der osmotische Wert vom Niveauwert abweicht.

11. Analytische Befunde legen die Vermutung nahe, daß die Osmoregulation ein Schattenbild der Ionenregulation ist.

Literatur

- Andel, O. M. van, W. H. Arisz, and R. H. Helder, 1950: Influence of light and sugar on growth and salt intake by maize. Proc. Kon. Nederl. Akad. Wetensch. 53, 159—171.
- Arisz, W. H., 1947: Uptake and transport of chlorine by parenchymatic tissue of leaves of *Vallisneria spiralis*. I, II. Ibid. 50, 1019—1032, 1235—1245.

- Arisz, W. H., 1948: Uptake and transport of chlorine by parenchymatic tissue of leaves of *Vallisneria spiralis*. III. Ibid. 51, 25—36.
- 1953: Active uptake, vacuole-secretion and plasmatic transport of chloride-ions in leaves of *Vallisneria spiralis*. Acta bot. néerl. 1, 506—515.
- 1954: Transport of chloride in the „symplasm“ of *Vallisneria* leaves. Nature 174, 223—224.
- 1956: Significance of the symplasm theory for transport across the root. Protoplasma 46, 5—62.
- Bächer, J., 1920: Über die Abhängigkeit des osmotischen Wertes von einigen Außenfaktoren. Beih. bot. Cbl. 37, 63—115.
- Beck, W. A., 1935: The effect of light in the O_g of plant tissues. I. Protoplasma 23, 203—209.
- Blum, G., 1958: Osmotischer Wert, Saugkraft, Turgor. Protoplasmatologia II, C 7 a.
- Bogen, J., 1953: Beiträge zur Physiologie der nichtosmotischen Wasseraufnahme. Planta 42, 140—155.
- 1956: Nichtosmotische Aufnahme von Wasser und gelösten Anelektrolyten. Ber. dtsh. bot. Ges. 69, 209—222.
- und H. Prell, 1953: Messungen nichtosmotischer Wasseraufnahme an plasmolysierten Protoplasten. Planta 41, 459—479.
- und G. Follman, 1955: Osmotische und nichtosmotische Stoffaufnahme bei Diatomeen. Planta 45, 125—146.
- Brauner, L. und M., 1937: Untersuchungen über den photoelektrischen Effekt in Membranen. I. Protoplasma 28, 230—261.
- Brauner, L., 1956: Die Beeinflussung des Stoffaustausches durch das Licht. Handb. d. Pflanzenphysiol. II, 381—397.
- Burg, A. H. van der, 1952: Influence of light on the absorption of potassium by maize plants in carbon dioxide free air. Proc. Kon. Nederl. Akad. Wetensch. C 55, 279—281.
- Collander, R., 1956: Der Zellsaft der Characeen. Protoplasma 25, 201—210.
- 1959: Permeabilitätsstudien an Characeen. III. Protoplasma 33, 215—257.
- Gessner, F., 1940: Untersuchungen über die Osmoregulation der Wasserpflanzen. Protoplasma 34, 593—600.
- Helder, R. J., 1952: Analysis of the process of anion uptake of intact maize plant. Acta bot. néerl. 1, 361—434.
- Hoagland, D. R., and A. R. Davis, 1923: The composition of the cell sap of the plant in relation to the absorption of ions. J. Gen. Physiol. 5, 629—646.
- — 1924: Further experiments on the absorption of ions by plants, including observations on the effect of light. Ibid. 6, 47—62.
- — 1929: The intake and accumulation of electrolytes by plant cells. Protoplasma 6, 610—626.
- P. L. Hibbard, and A. R. Davis, 1927: The influence of light, temperature, and other conditions on the ability of *Nitella* cells to concentrate halogens in the cell sap. J. Gen. Physiol. 10, 121—146.
- Höfler, K., und W. Url, 1937: Kann man osmotische Werte plasmolytisch bestimmen? Ber. dtsh. bot. Ges. 70, 462—476.
- Holm-Jensen, IB., A. Krogh, and V. Wartiovaara, 1944: Some experiments on the exchange of potassium and sodium between single cells of Characeae and the bathing fluid. Acta Bot. Fenn. 36, 5—22.

- Ingold, C. T., 1936: The effect of light on the absorption of salts by *Elodea canadensis*. New Phytologist 35, 132—141.
- Iwanami, Y., 1954 a, b: Physiological researches of pollen. VI., VII. Bot. Mag. Tokyo 67, 28—33, 134—137 (japanisch).
- Kamiya, N., and K. Kuroda, 1956: Artificial modification of the osmotic pressure of the plant cell. Protoplasma 46, 423—436.
- Lüttkus, K., und B. Böttcher, 1939: Über die Ausscheidung von Aschenstoffen durch die Wurzeln. I. Planta 29, 325—340.
- MacRobbie, E. A. C., and J. Dainty, 1958: Ion transport in *Nitellopsis obtusa*. J. Gen. Physiol. 42, 335—353.
- Nagai, R., 1959: Studies on osmoregulation in the plant cell. Master's Thesis. Fac. Sci., Osaka Univ. (japanisch).
- Nishizaki, Y., 1955: Bioelectric phenomena accompanying osmosis in a single plant cell. Cytologia 20, 32—40.
- Sakamura, T., 1952: Osmophysiology der Pflanzenzelle. Unveröffentlichte Data von Stow auf S. 77. Yökendō, Tokyo (japanisch).
- Scott, G. T., and H. R. Hayward, 1954: Evidence for the presence of separate mechanisms regulating potassium and sodium distribution in *Ulva lactuca*. J. Gen. Physiol. 37, 601—620.
- Tazawa, M., 1957: Neue Methode zur Messung des osmotischen Wertes einer Zelle. Protoplasma 48, 342—359.
- Teorell, T., 1949: Permeability. Ann. Rev. Physiol. 11, 545—564.
- Tröndle, A., 1909: Permeabilitätsveränderung und osmotischer Druck in den assimilierenden Zellen des Laubblattes. Ber. dtsh. bot. Ges. 27, 71—78.
- 1910: Der Einfluß des Lichts auf die Permeabilität der Plasmahaut. Jb. wiss. Bot. 48, 171—282.
- Ussing, H. H. 1949: Transport of ions across cellular membranes. Physiol. Rev. 29, 117—155.

Cytologische Studien VII
Strukturaspekte der Grundsubstanz
des Cytoplasmas nach Einwirkung verschiedener Fixierungsmittel*
Untersuchungen am Hyaloplasma von Amöben der
Limax- und *Proteus-*Gruppe

Von

K. E. Wohlfarth-Bottermann

Aus dem Zentral-Laboratorium für angewandte Übermikroskopie am Zoologischen
Institut der Universität Bonn

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. Juli 1960)

I. Einleitung und Fragestellung

Eine der interessantesten und wichtigsten Fragen der Protoplasmaforschung, nämlich die nach der Feinstruktur der Grundsubstanz des Cytoplasmas — die allgemein auch als Hyaloplasma bezeichnet wird —, kann bisher nicht als beantwortet gelten. Obgleich die Elektronenmikroskopie im vergangenen Jahrzehnt erstaunlich reiche neue Erkenntnisse bei der strukturellen Analyse der lebenden Substanz erbracht hat, indem sie die Neuentdeckung zahlreicher cytoplasmatischer Strukturelemente und die Aufdeckung ihres räumlichen Zusammenhanges ermöglichte, ist noch völlig ungeklärt, ob die Struktur der eigentlichen Matrix des Cytoplasmas überhaupt elektronenmikroskopisch erkannt werden kann: Es ist nämlich unbekannt bzw. umstritten, ob die hier zu vermutenden Strukturelemente — seien sie granulärer oder fädiger Natur — amikroskopischer oder sublichtmikroskopischer Größenordnung sind. Die große Bedeutung dieser Frage braucht hier nicht dargelegt zu werden (vgl. hierzu Zeiger 1943, Frey-Wyssling 1955, 1957, Haas 1955, Mellors 1955, Giese 1957, Engström und Finean 1958, Policard und Baud 1958, Schmitt 1959, Oberling 1959). Sowohl an pflanzlichen als auch an tierischen Zellen sind daher Versuche unternommen worden, die Grundstrukturen des Cytoplasmas an Hand von Dünnschnitten — zumeist nach

* Herrn Prof. Dr. R. Danneel zur Vollendung seines 60. Lebensjahres gewidmet.

Osmiumfixation der Zellen — zu analysieren. Für die pflanzliche Zelle sind hier besonders die Untersuchungen von Strugger (1956, 1957 a—c, 1959) und Sitte (1958) zu nennen. Während die Arbeiten von Strugger zur Aufstellung einer „Cytomemata“-Hypothese führten, wonach sich „schraubig gewundene Fäden als disperse Phase“ im Grundcytoplasma aller von ihm untersuchten Zellen nachweisen lassen sollen, wird die Richtigkeit dieser Deutung von anderen Botanikern bestritten (Sitte 1958, Menke 1957 c, Schnepf 1960). Sitte kommt vielmehr nach Untersuchungen am gleichen Objekt (Wurzelmeristemzellen) zu dem Schluß, daß sich das „Grundplasma“ mindestens aus zwei Komponenten, einer „granulären“ und einer diese Granula einschließenden „Matrix“ zusammensetzt. Diese Matrix, „das eigentliche Plasma ist bei der unter den angegebenen Beobachtungsbedingungen erreichten Auflösung amorph“ (Sitte 1958).

Obgleich das bislang vorliegende Beobachtungsmaterial an tierischen Zellen erheblich größer ist, liegen die Verhältnisse hier noch keineswegs klarer. Läßt man Befunde und Theorien außer Betracht, die vor der jetzt erreichten Verfeinerung der elektronenmikroskopischen Präparationstechnik erzielt bzw. aufgestellt wurden (vgl. hierzu Wohlfarth-Bottermann 1954, 1957, Haas 1955), so sind im wesentlichen nur folgende Auffassungen zu nennen: Während Sjöstrand noch 1955 Granula, fadenförmige Elemente und Membranstrukturen (die heute allgemein als „endoplasmatisches Retikulum“ bezeichnet werden) als zur Grundsubstanz gehörend anspricht, wurden von Rhodin (1954) und Schneider (1959) granuläre und fädige Elemente, von Sjöstrand und Rhodin (1953) und Zetterqvist (1956) granuläre Komponenten und von Rhodin und Dalham (1956) eine elektronenoptisch homogene Struktur der Grundsubstanz gefunden. Weissenfels (1957) beschreibt für tierische Zellen (entsprechend den Befunden von Strugger an Pflanzenzellen) das Vorkommen schraubig gewundener Fäden (Cytomemata im Sinne von Strugger), während Miller (1959) die wohl verbreitetste Ansicht zu dieser Frage in folgenden Worten zusammenfaßt: „Als Grundcytoplasma, Hyaloplasma oder Matrix (im elektronenoptischen Sinn) wird ... der auch bei optimaler Fixierung und Auflösung strukturlos erscheinende, oder nur feine, ungeordnete Fäden ... oder Granula (reduziertes O_8O_4 ?) aufweisende Teil des Protoplasmas bezeichnet. Diese Bezeichnung ist willkürlich und umschreibt lediglich unser derzeitiges Unvermögen, Strukturen in einem Bereich aufzulösen, der sicher nicht strukturlos ist. Zu den heute diskutierten Vorstellungen von der Struktur des Hyaloplasmas (Frey-Wyssling 1955, Zeiger 1955) können elektronenoptische Fixationsbilder an der Grenze des Auflösungsvermögens wenig beitragen; außerdem machen sich hier kleine Fokussierungs- oder optische Fehler und das Plattenkorn störend bemerkbar“ (Miller 1959).

Abgesehen von diesen mit den Worten von Miller genannten Schwierigkeiten ist darauf hinzuweisen, daß die meisten Autoren ihre Befunde an Cytoplasmen erhoben haben, die heute nicht mehr im strengen Sinne als Hyaloplasma zu bezeichnen sind. So glauben wir heute durch die Arbeiten von Siekevitz und Palade (1958) zu wissen, daß granuläre Elemente mit einem Durchmesser von 150 bis 300 Å (nach Osmiumtetroxyd-

Fixation) die Träger der Ribonucleinsäure in basophilen Cytoplasmabezirken sind. Solche Bestandteile des Cytoplasmas der tierischen Zelle wie diese — zumeist bestimmten Membrankomponenten anliegenden — RNS-haltigen Granula („Palade-Granula“, „Small particulate components“, „Meiosomen“, „Ribosomen“) sollten nicht mit der Grundsubstanz des Cytoplasmas verwechselt (vgl. Brachet 1957, Gross und Mitarbeiter 1960) und dürfen auch dann nicht als seine eigentlichen Bausteine angesprochen werden, wenn sie — wie häufig in schwächer basophilen Cytoplasmabezirken — ohne Membrankomponente vorkommen und dann einen granulären Aufbau der Grundsubstanz vortäuschen, in die sie in Wirklichkeit aber nur zusätzlich eingebettet sind. Zum Teil können diese granulären Elemente so dicht in die Grundsubstanz des Cytoplasmas eingelagert sein, daß sie als die wesentlichen Strukturelemente der Matrix selbst erscheinen (Afzelius 1957, Wohlfarth-Bottermann 1958, Gross und Mitarbeiter 1960).

Es würde auch zumindest zu Unklarheiten in der Definition führen, wenn man wie Porter das Cytoplasma in zwei Phasen einteilt, nämlich 1. die „Innenräume“ des Endoplasmatischen Retikulums und 2. die Phase außerhalb des Endoplasmatischen Retikulums, und diese letztere generell als „cytoplasmatische Matrix“ bezeichnet. Als cytoplasmatische Matrix, als die Grundsubstanz des Cytoplasmas, sollte man heute zweckmäßigerweise nur noch den Anteil des Cytoplasmas auffassen, in dem die elektronenoptisch gut definierten Membranstrukturen (wie z. B. das Endoplasmatische Retikulum) und morphologisch und biochemisch einigermaßen gut analysierte partikuläre Elemente (wie z. B. die RNS-haltigen Palade-Granula) eingelagert sind. Der so gefaßte Begriffsinhalt des „Grundcytoplasmas“ ist also dann enger, als er z. B. von Frey-Wyssling (1953) definiert wurde, der noch das Ergastoplasma als „lamellären Strukturaspekt“ der cytoplasmatischen Matrix bezeichnete. Die fortschreitenden Erkenntnisse der letzten Jahre mußten zu einer bedeutenden Einengung des Begriffs führen, ähnlich wie seinerzeit durch die Einführung leistungsfähiger Lichtmikroskope „gewisse Granula“ des Cytoplasmas als Mitochondrien vom Cytoplasma abgetrennt wurden: Das Hyaloplasma im Sinne der Lichtmikroskopie ist durch die Elektronenmikroskopie weiter unterteilt worden: Nur ein Teil des Hyaloplasmas im lichtmikroskopischen Sinne erscheint uns bisher elektronenoptisch noch als „hyalin“, weil wir bisher hierin zumindest keine Elemente nachweisen können, die sich morphologisch einigermaßen gut definieren lassen¹. Diese im engeren Sinn „hyaloplasmatische Matrix“ des Cytoplasmas mag im folgenden auch als „Grundcytoplasma“ bezeichnet werden.

Die vorliegende Arbeit soll sich also mit dem Hyaloplasma im elektronenoptischen Sinne des Wortes beschäftigen. Die vorstehenden Ausführungen zeigen, daß in Anbetracht der zahlreichen Artefaktmöglichkeiten und der

¹ „... the term cytoplasm is defined by the negative property of comprising that fraction of the living substance that escapes our morphological analysis“ (Frey-Wyssling 1957).

Tatsache, daß die Untersuchungen verschiedener Autoren nur schlecht vergleichbar sind, die Frage schwer entscheidbar scheint, ob die Feinstruktur der Grundsubstanz des Cytoplasmas mit Hilfe der Elektronenmikroskopie analysierbar ist. Verschiedene Strukturaspekte der Grundsubstanz des Amöbencytoplasmas sind in einer vorangehenden Mitteilung in dieser Zeitschrift beschrieben worden (Wohlfarth-Bottermann 1960). Dies Hyaloplasma wurde vom Verfasser nach Osmiumtetroxyd-Kaliumbichromat-Fixierung und Kaliumpermanganat-Fixierung als aus anscheinend vernetzten, fädigen Elementen bestehend gefunden, deren Dimension nahe der Grenze der elektronenmikroskopischen Auflösbarkeit liegt. Es wurde gleichzeitig darauf hingewiesen, daß alle Übergänge bis zu einem völlig homogenen Strukturaspekt existieren und daß diese Befunde durch weitere Untersuchungen nach Anwendung verschiedener Fixierungs- und Kontrastierungsmethoden geprüft werden sollten.

Die vorliegende Untersuchung soll die Beantwortung folgender Fragen gestatten:

1. Sind die mit Osmiumtetroxyd-Kaliumbichromat gefundenen Strukturaspekte auch nach Anwendung anderer Fixierer zu beobachten?
2. Sind die mit Osmiumtetroxyd-Kaliumbichromat gefundenen Strukturaspekte auch ohne jede Anwendung spezieller Kontrastierungsmethoden sichtbar zu machen?
3. Sind die beobachteten verschiedenen Strukturaspekte nach Osmiumtetroxyd-Kaliumbichromat-Fixierung auch bei Anwendung anderer Fixierer innerhalb einer Fixation und innerhalb einer Zelle nachweisbar? Mit anderen Worten: Ergeben verschiedene Fixierungsmittel die gleiche Skala der Strukturaspekte, d. h. einen ähnlichen Pleomorphismus, wie er nach Osmiumtetroxyd-Kaliumbichromat-Fixation nachweisbar ist?

Das Ergebnis dieser Prüfung versprach weitere Hinweise auf den Äquivalentwert der bisher dargestellten Strukturen und gewonnenen Befunde (Wohlfarth-Bottermann 1960) insofern, als eine Übereinstimmung verschiedener Fixierungsmittel für einen hohen Äquivalenzgrad, wesentliche Unterschiede bei verschiedener Fixation aber gegen einen solchen sprechen mußten.

Das Hyaloplasma („Ektoplasma“) der Amöben eignet sich zur Untersuchung der cytoplasmatischen Matrix besonders gut, weil es als Hyaloplasma im klassischen Sinne frei von allen mikroskopisch erkennbaren Einschlüssen ist, also wirklich den Prototyp des homogenen Cytoplasmas, seine reine Grundsubstanz darstellt. In der vorliegenden Arbeit sollen Ergebnisse nach Anwendung verschiedener Fixierer und verschiedener Fixier-Kombinationen beschrieben und diskutiert werden, die in Fortsetzung der Untersuchungen (insbesondere Wohlfarth-Bottermann 1960) an der für unsere Fragestellung besonders günstigen Amöbe *Hyalodiscus simplex* Wohlfarth-Bottermann 1960, vergleichend auch bei *Amoeba proteus*, erzielt wurden. Die überraschende Ähnlichkeit der Struktur der Grundsubstanz bei Anwendung verschiedener Fixierer einerseits und die erhebliche Strukturvariabilität bei gleicher Fixation andererseits er-

scheinen so bemerkenswert, daß sie in der vorliegenden Studie als Beitrag zur Frage nach der Struktur der Grundsubstanz des Cytoplasmas niedergelegt werden sollen.

II. Material und Methoden

A. Untersuchungsobjekte

1. *Amöben*. Der Hauptteil der Untersuchungen erstreckte sich auf das hyaline Ektoplasma der Amöbe *Hyalodiscus simplex* Wohlfarth-Bottermann 1960, deren licht- und elektronenmikroskopische Struktur in dieser Zeitschrift beschrieben wurde (Wohlfarth-Bottermann 1960). Kultur und Einbettungstechnik waren die gleichen, wie sie in der genannten Arbeit ausführlich dargelegt sind. Alle in der vorliegenden Arbeit enthaltenen Bilder von *Hyalodiscus* stellen Sagittalschnitte durch den ektoplasmatischen Lappen dieser Amöbe dar.

Zur Ergänzung gelangten verschiedene, aus der Natur isolierte Stämme von *Amoeba proteus* zur Untersuchung (Kultur siehe bei Schneider und Wohlfarth-Bottermann 1959). *Amoeba proteus* wurde wie *Hyalodiscus simplex* im „Großblockverfahren“ (Wohlfarth-Bottermann 1960) eingebettet, zum Teil aber auch einzeln in Gelatine-Kapseln überführt.

2. *Gelatine-Gele* (Untersuchungen W. Theimer). Blattgelatine von Merck wurde in Konzentrationen von 1, 2, 4, 6 und 8% bei 90° C in destilliertem Wasser gelöst, nach Filtration bei Zimmertemperatur abgekühlt und in verschiedenen Altersstufen fixiert und eingebettet. Nähere Angaben siehe bei Theimer (1960).

3. *Nichtmyogene Begleitzellen* aus einer 1½ Tage alten Gewebekultur von Hühnerherzmyoblasten².

4. *Embryonale Pankreas-Zellen der weißen Maus*. Die Gewebeproben wurden 12 bis 19 Tage alten Embryonen entnommen.

B. Fixierungen

Die Untersuchung von *Hyalodiscus simplex* erfolgte vergleichend nach Fixierung mit den nachstehend unter 1 bis 8 aufgeführten Mitteln. *Amoeba proteus* wurde nur nach Ziffer 1 bis 4 fixiert, die Gelatine-Gele und die embryonalen Pankreas-Zellen ausschließlich nach 1 und die Gewebekulturen nur nach Ziffer 9.

1. ^{1b}: Gemisch von 1% Osmiumtetroxyd und 1% Kaliumbichromat, gepuffert mit Kaliumhydroxyd auf pH 7,0 bzw. 6,98, mit nachfolgender Kontrastierung während der Entwässerung der Objekte mittels einer Lösung von 1% Phosphorwolframsäure und 0,5% Uranylacetat in 75%igem Aceton (Wohlfarth-Bottermann 1957). Die Fixierungslösung enthielt keinerlei Salzzusätze („Stammlösung B“ bestand also aus destilliertem Wasser).

² Für die Überlassung der Gewebekulturzellen danke ich Herrn Dozent Dr. N. Weissenfels.

2. 1^h: 1% Osmiumtetroxyd, gepuffert mit Veronalacetat auf pH 7,15 bzw. 7,11 (Sjöstrand 1956). Keine gesonderte Kontrastierung.

3. 1^h: 1% Kaliumpermanganat, gepuffert mit Veronalacetat auf pH 7,15 bzw. 7,0 (Luft 1956). Keine gesonderte Kontrastierung.

4. 1^h: 10% neutralisiertes Formalin, gepuffert mit Veronalacetat auf pH 7,15 bzw. 7,12 (Wohlfarth-Bottermann 1956). Kontrastierung mit 1% Phosphorwolframsäure und 0,5% Uranylacetat in 75%igem Aceton.

5. 1^h: 10% neutralisiertes Formalin, mit Sörensen-Puffer auf pH 6,9 eingestellt. Kontrastierung mit 1% Phosphorwolframsäure und 0,5% Uranylacetat in 75%igem Aceton.

6. Doppelfixation

1^h: 10% Formalin (pH 7,15) mit Veronalacetat, nachfolgend

1^h: 1% Osmiumtetroxyd (pH 7,15) nach Sjöstrand (1956).

Keine gesonderte Kontrastierung.

7. Doppelfixation

1^h: 10% Formalin (pH 6,9) mit Sörensen-Puffer, nachfolgend

1^h: 1% Osmiumtetroxyd (pH 7,15) nach Sjöstrand (1956).

Keine gesonderte Kontrastierung.

8. Doppelfixation

1^h: 1% Osmiumtetroxyd (pH 7,15) nach Sjöstrand (1956), nachfolgend

1^h: 10% Formalin (pH 7,15) mit Veronalacetat.

Keine gesonderte Kontrastierung.

9. Gemisch von 1% Osmiumtetroxyd und 1% Kaliumbichromat, gepuffert mit Kaliumhydroxyd auf pH 7,3 unter Zusatz von 1,5% Rohrzucker und 0,3% Traubenzucker. Kontrastierung mit 1% Phosphorwolframsäure und 0,5% Uranylacetat in 75%igem Aceton. Anwendung ausschließlich bei Gewebekulturzellen.

Bei allen Objekten erfolgte nach ihrer Fixation eine einstündige Wässerung in Tyrode-Lösung.

C. Entwässerung

Die Entwässerungsstufen bestanden für Methacrylat-Einbettungen in einer Alkoholreihe (70, 96, 100%) und für Vesiopal-Einbettungen in einer Acetonreihe

Abb. 1. *Hyalodiscus simplex*. Sagittalschnitte durch den hyaloplasmatischen Lappen („Ektoplasma“). Verschiedener Strukturaspekt des Grundcytoplasmas (Hyaloplasma) bei gleicher Fixation (Osmium-Chrom, Wohlfarth-Bottermann 1957). Während in Abb. 1a ein mehr oder weniger homogener Strukturaspekt vorherrscht, scheint sich das Cytoplasma in Abb. 1b und c vorwiegend aus granulären Elementen aufzubauen. In Abb. 1d und e dagegen sind deutlich fädige Elemente zu erkennen, die den Eindruck eines Netzwerkes erwecken. In der linken oberen Bildecke ist jeweils die Zellmembran der Amöbe zur Darstellung gebracht. Elektronenoptisch 14.000 : 1, Endvergrößerung 85.000 : 1.

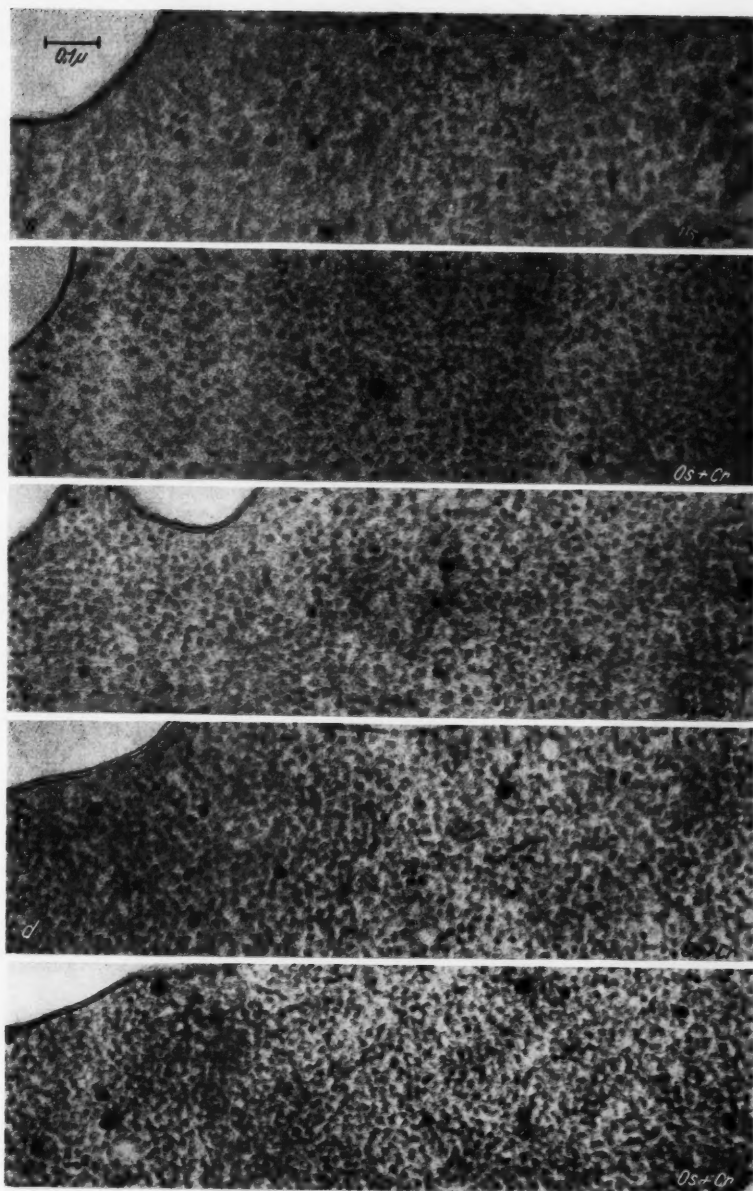


Abb. 1.

(50, 50, 75, 90, 100%). Ob eine Nachkontrastierung auf der Stufe des 70%igen Alkohols oder des 75%igen Acetons vorgenommen wurde, ist jeweils bei den einzelnen Fixierungsmitteln (siehe Absatz B) angegeben.

D. Einbettung

Methacrylat- und Vestopal-Einbettung. Mit Ausnahme von Abb. 10 a kommen ausschließlich vestopaleingebettete Objekte in dieser Arbeit zur Darstellung. Die Polymerisation der Vestopal-Blöckchen erfolgte zunächst für 12 Stunden im Thermostaten bei 60° C. Nach Ablauf der Frist sind die Blöckchen bereits fast vollständig ausgehärtet. Anschließend wurde die Temperatur für weitere 24 bis 48 Stunden auf 90° C erhöht. Nach anschließender Abschaltung der Wärmezufuhr verblieben die Präparate für weitere 12 bis 24 Stunden im (sich langsam abkühlenden) Thermostaten. Ein solches Vorgehen scheint die Schneidequalität der eingebetteten Objekte insofern zu verbessern, als eine festere Haftung an die Grenze Einbettungsmittel—Objekt erzielt wird, wodurch die Zellen weniger zum Herausbrechen während des Schneidevorganges neigen.

E. Ultramikrotomie

Die Herstellung der Dünnschnitte geschah auf Mikrotomen der Firmen LKB, Stockholm (Ultratome 4801 A), Servall, Connecticut (Porter-Blum) und Leitz, Wetzlar (Fernandez-Morán) mit Hilfe von Glasmessern. Die Objektträger bestanden aus Formvar-Filmen. *Hyalodiscus simplex* wurde ausschließlich sagittal geschnitten, um eine genaue Orientierung zu erzielen (vgl. Wohlfarth-Bottermann 1960).

F. Elektronenmikroskopie

Sämtliche Aufnahmen wurden mit einem Siemens-Elektronenmikroskop vom Typ UM 100 d bei 60 KV und einer Aperturblende von 30 μ auf Agfa-AGP-Film im Format 6,5 \times 9 cm erzielt. Die Primärvergrößerung betrug zumeist 14.000 : 1. Vergleichsuntersuchungen erfolgten mit Hilfe eines Elmiskop I der gleichen Firma sowie an einem Akashi-Tronscope vom Typ TRS 50.

Die Elektronenmikroskope wurden dankenswerterweise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt. Das Kultusministerium des Landes Nordrhein-Westfalen unterstützte die Arbeiten durch eine Sachbeihilfe zur Bestreitung von Personalunkosten (A. Z. IF 3-03-16 F). Die Untersuchungen an Gelatine-Gelen führte Herr Dipl. Chemiker W. Theimer durch, Frau B. Koeppe-Lesche und Frau E. Holm danke ich wiederum für ihre technische Assistenz, Frau M. Sauernheimer für die phototechnischen Arbeiten.

Abb. 2. *Hyalodiscus simplex*. Zellmembran und Grundcytoplasma. Drei Aufnahmen aus einer Fokuserie. Die granulären bzw. fädigen Elemente (Pfeil-Markierungen $\uparrow\uparrow$) können nicht mit dem Negativkorn verwechselt werden und sind in ihrem Auftreten weitgehend unabhängig von der Fokussierung. Auch die Feinstruktur des Einbettungsmittels (Vestopal W) ist mit den Strukturelementen des Grundcytoplasmas nicht zu verwechseln. Die verschiedene Schärfe der Aufnahmen a, b und c erkennt man am besten an der Zellmembran (weiße Pfeilmarkierung \uparrow). Osmium-Chrom-Fixierung (Wohlfarth-Bottermann 1957). Elektronenoptisch 14.000 : 1. Endvergrößerung 160.000 : 1.

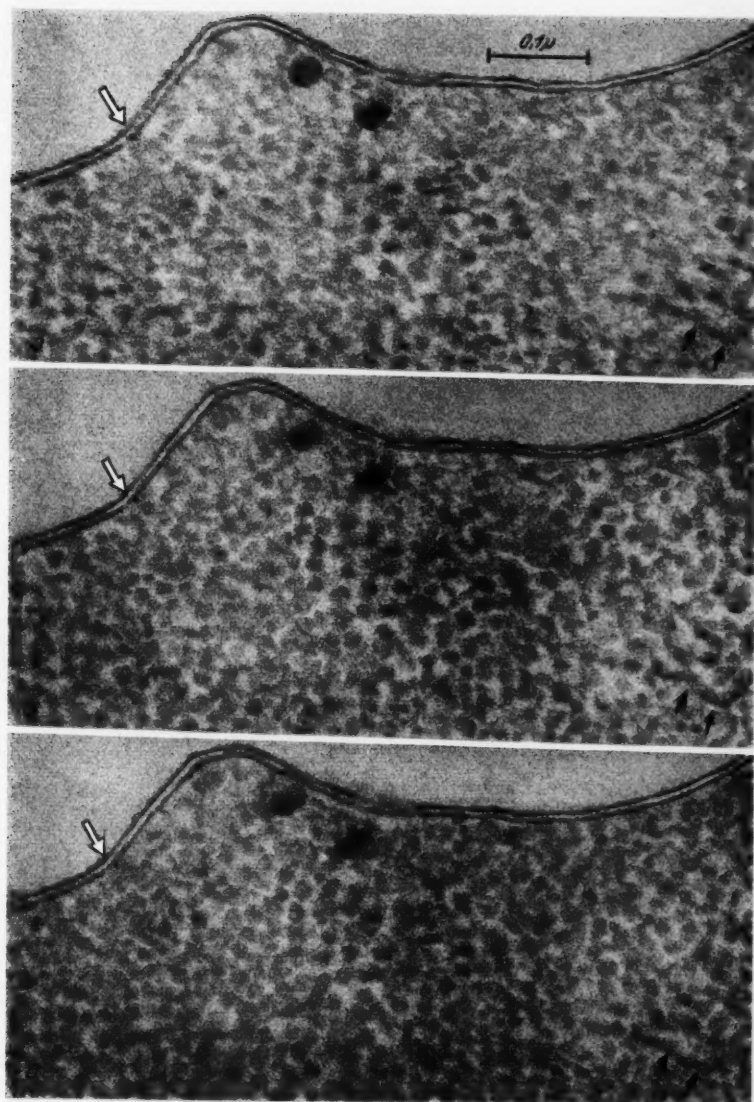


Abb. 2.

III. Ergebnisse

Die Abb. 1 bis 7 (mit Ausnahme Abb. 4 c) stellen Ausschnitte aus dem Hyaloplasma von *Hyalodiscus simplex* dar, und zwar bei sagittaler Schnittführung durch die Amöbe. Da Hyaloplasma (Ektoplasma) und Endoplasma bei den Normalformen von *Hyalodiscus* streng räumlich getrennt sind in dem Sinne, daß sich am vorderen Pol der Zelle immer der „hyaloplasmatische Lappen“, am hinteren Pol dagegen der „endoplasmatische Höcker“ der Amöbe befindet, ist eine Identifizierung des Hyaloplasmas (Grundplasma) mit Sicherheit gewährleistet (Wohlfarth-Bottermann 1960). Abgesehen davon bereitet aber auch die Erkennung des lappenförmigen Pseudopodiums dieser Amöbe, das immer nur in Einzahl vorkommt, selbst bei Wahl einer anderen Schnitttrichtung nie Schwierigkeiten.

Abb. 1 zeigt fünf verschiedene Strukturaspekte des Grundcytoplasmas bei gleicher Fixation der Zellen, nämlich nach Anwendung des Gemisches Osmiumtetroxyd-Kaliumbichromat. Jeweils in der linken oberen Bildecke ist ein Teil der Zellmembran dargestellt sowie daran anschließend die Grundstruktur des reinen Einbettungsmittels, so daß man an der Zellmembran die Schärfe der Abbildung und an der Grundstruktur des Vestopals seine Eigenstruktur bzw. den Einfluß des Plattenkorns kontrollieren kann.

Von einer mehr oder weniger homogenen Struktur einerseits (Abb. 1 a) bis zu einer sehr dichten Packung mehr fadenförmiger, wahrscheinlich vernetzter Strukturen andererseits (Abb. 1 e) kommen alle Übergänge (Abb. 1 b—d) vor. Dieses breite Strukturspektrum ergibt sich regelmäßig bei Fixation der Amöben mit dem Gemisch 1% Osmiumtetroxyd und 1% Kaliumbichromat. Sowohl fast strukturloses Grundcytoplasma einerseits, dichtes, fädiges Grundcytoplasma andererseits als Extreme und alle (vermutlichen) Übergangsformen kommen etwa gleich häufig bei normalen, experimentell unbeeinflussten Amöben vor, wenn man *Hyalodiscus simplex* in der Kulturschale „in situ“, das heißt ohne die Amöben vor ihrer Fixation in irgendeiner Weise zu beeinflussen, mit dem zu prüfenden Fixationsmittel nach Dekantieren der Kulturflüssigkeit übergießt.

In dem fast homogenen Cytoplasma (Abb. 1 a) hat man bei den relativ wenigen hierin vorkommenden, kontrastreicher Partikeln den Eindruck, daß es sich um granuläre Elemente handelt². Der Durchmesser dieser Granula im sonst fast strukturlosen Grundcytoplasma (Abb. 1 a) liegt etwa bei 80 bis 90 Å. Die Elemente, die man dagegen im kontrastreicher Grundcytoplasma (Abb. 1 e) findet, scheinen zumeist einen Durchmesser von 160 bis 180 Å zu besitzen. Es handelt sich im letzteren Fall jedoch zum größten Teil wohl nicht wirklich um granuläre Elemente, sondern um fadenförmige Strukturen, die in ihrer Anordnung den Eindruck einer Vernetzung erwecken. Auf anderen Abbildungen (vgl. Abb. 2, 3, 4 und 5) wird dies noch

² Die auf allen Bildern dargestellten größeren, völlig geschwärzten Partikel sind in diesem Zusammenhang ohne Belang (vgl. Wohlfarth-Bottermann 1960), sie lassen sich nach allen hier geprüften Fixationsmitteln nachweisen, auch wenn dies auf den hier vorgelegten Bildern nicht zur Darstellung kommt.

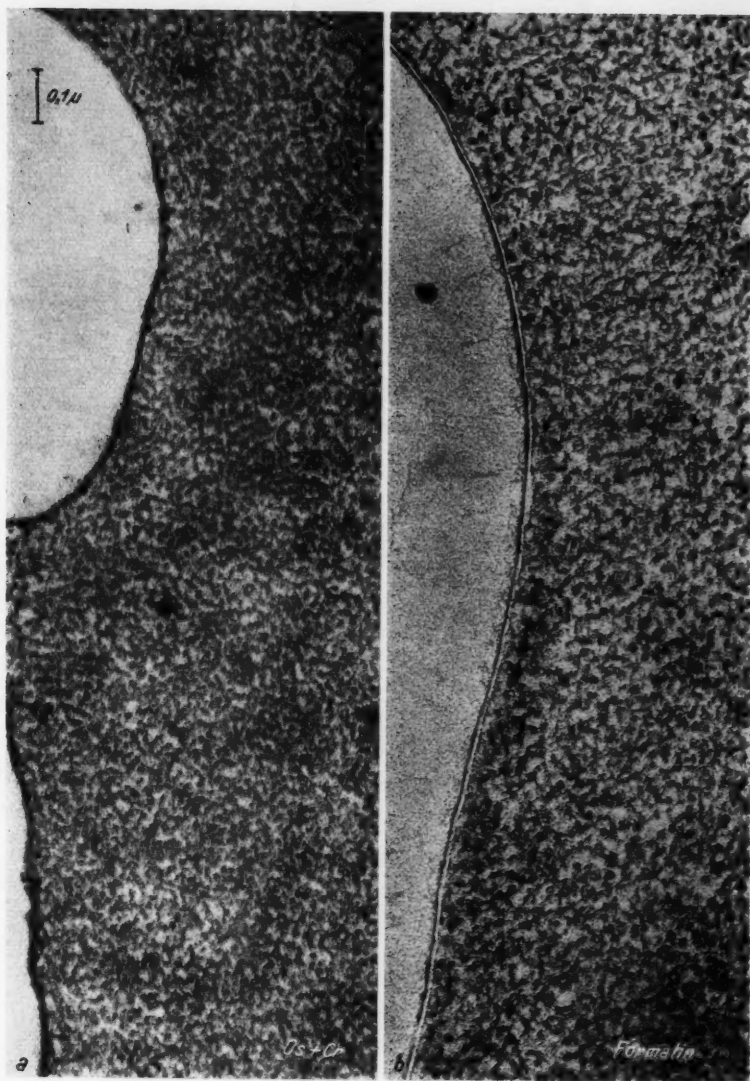


Abb. 3. *Hyalodiscus simplex*. Sagittalschnitte durch den hyaloplasmatischen Lappen („Ektoplasma“). Fädig retikularer Strukturaspekt des Grundcytoplasmas nach Osmium-Chrom-Fixierung (Abb. 3 a) und Formalin-Fixierung (Abb. 3 b). Elektronenoptisch 14.000 : 1, Endvergrößerung 85.000 : 1.

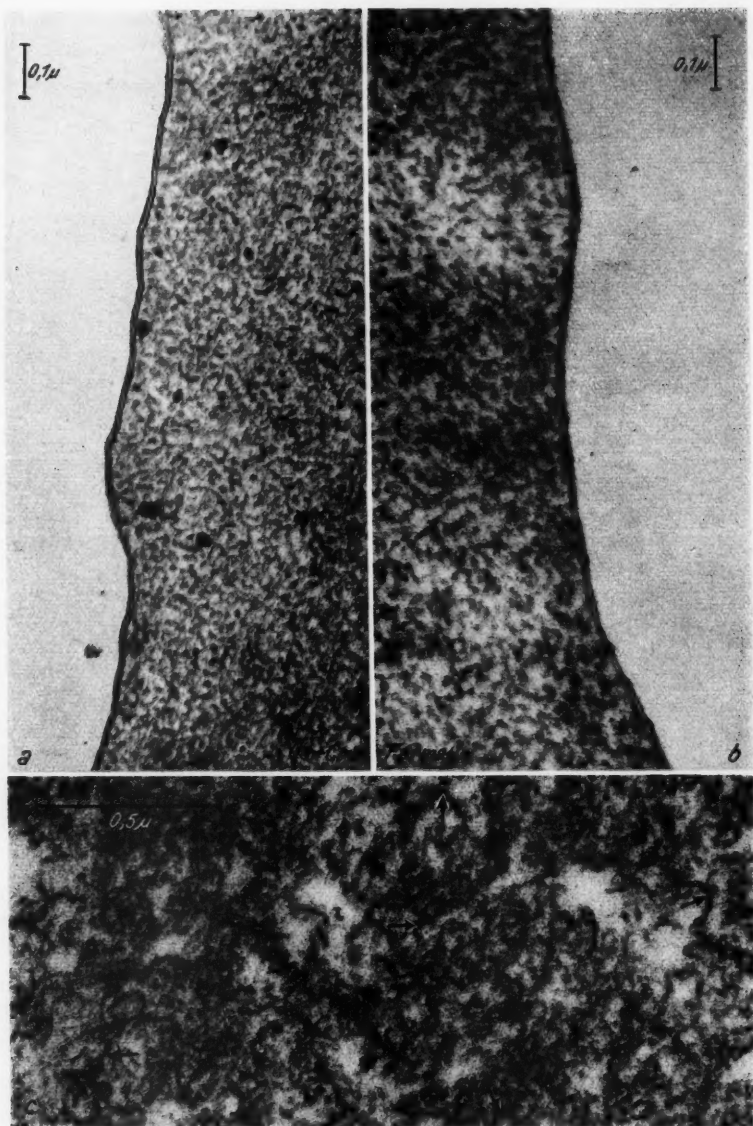


Abb. 4 a und b. *Hyalodiscus simplex*. Sagittalschnitte durch den hyaloplasmatischen Lappen („Ektoplasma“). Erstaunlich ähnliche Struktur des Grundcytoplasmas nach Osmium-Chrom-Fixierung (Abb. 4 a) und Formalin-Fixierung (Abb. 4 b). Elektronenoptisch 14.000 : 1, Endvergrößerung 85.000 : 1. — Abb. 4 c. *Amoeba proteus*. Hyaloplasma nach Osmiumtetroxyd-Fixierung. An den durch Pfeile markierten Stellen sind fädige Strukturelemente besonders gut zu erkennen. Elektronenoptisch 6900 : 1, Endvergrößerung 60.000 : 1.

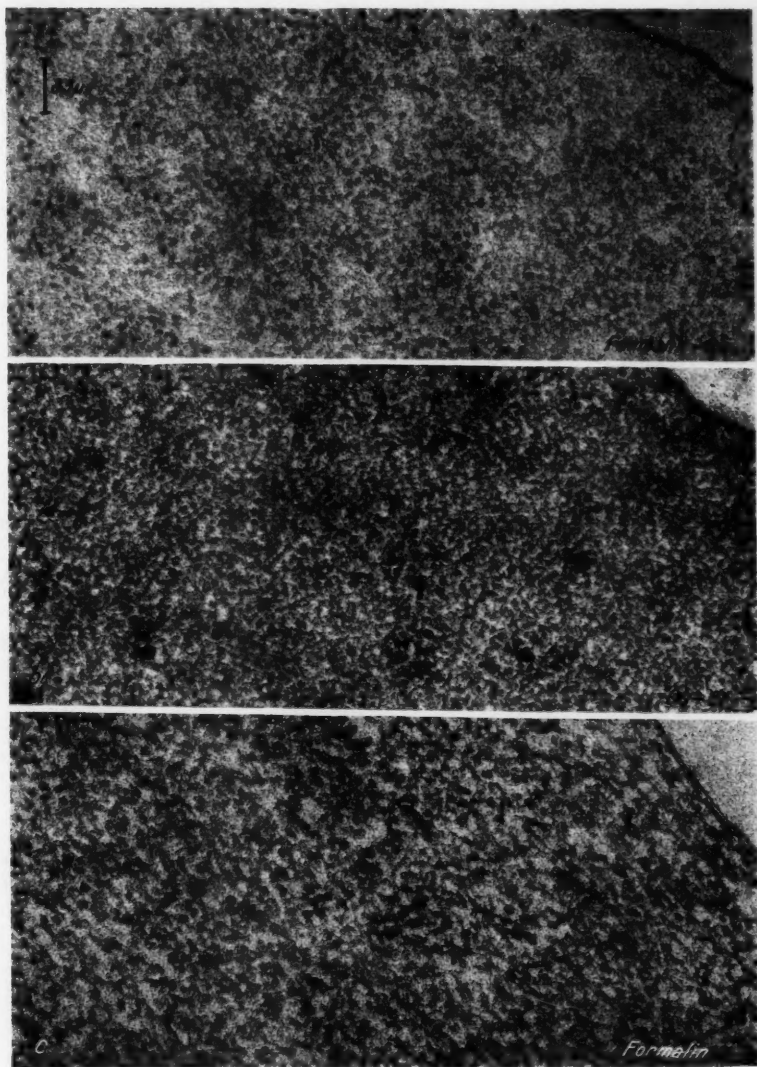


Abb. 5. *Hyalodiscus simplex*. Sagittalschnitte durch den hyaloplasmatischen Lappen („Ektoplasma“). Granulärfädiger Strukturaspekt nach verschiedener Fixation. Abb. 5a: Formalin-Fixierung mit nachfolgender Osmiumtetroxyd-Fixierung. Abb. 5b: Osmium-Chrom-Fixierung. Abb. 5c: Fixierung ausschließlich mit Formalin. In der rechten oberen Bildhälfte ist jeweils die Zellmembran dargestellt. Elektronenoptisch 14.000 : 1, Endvergrößerung 85.000 : 1.

deutlicher. Es sei hier aber bereits darauf hingewiesen, daß bei einem Faden-durchmesser unterhalb 200 Å und bei einer zu veranschlagenden Schnittdicke von 400 bis 600 Å (vgl. Bachmann und Sitte 1959) eine Vernetzung durch Übereinanderprojektion von Fadenstrukturen in Anbetracht der großen Schärfentiefe des elektronenoptischen Bildes für möglich gehalten werden muß. Bei einem Nachweis von fadenförmigen Elementen kann also deren Vernetzung, das heißt ihre Berührung in Form von ausgesprochenen Haftpunkten, nur schwer mit Sicherheit belegt werden.

Abb. 2 gibt in drei verschiedenen Aufnahmen aus einer Fokussierungsserie einen Bereich des Grundcytoplasmas bei besonders starker Vergrößerung (160.000fach) wieder. Der verschiedene Fokus der Einzelaufnahmen a bis c ist am besten an dem mit weißem Pfeil markierten Bereich der Zellmembran zu erkennen. Da die hier diskutierten granulären bzw. fädigen Elemente (Doppelpfeilmarkierung) unabhängig von der Scharfstellung des Bildes und auch unabhängig vom Negativkorn auf allen Aufnahmen gleich gut zu erkennen sind, ist ihre Verwechslung mit rein optischen oder phototechnischen Scheinstrukturen ausgeschlossen. Der fädige Charakter der Strukturelemente kommt besonders gut an den jeweils mit Doppelpfeil markierten Stellen zum Ausdruck.

In Abb. 3 und 4 a und b sind jeweils eine Osmium-Chrom-Fixierung und eine Formalin-Fixierung gegenübergestellt. Insbesondere bei Abb. 4 a und b überrascht der hohe Grad der Ähnlichkeit der Strukturen, die nach verschiedener Fixation (bei gleicher Kontrastierung mit 1% Phosphorwolframsäure und 0,5% Uranylacetat) erhalten werden. In Abb. 3 b tritt bei der Formalin-Fixierung an einigen Stellen, besonders im oberen Drittel der Abbildung, die Fadennatur der Strukturelemente zu Tage. Durchweg kann man — wie an diesen beiden Abbildungen — feststellen, daß das Cytoplasma nach Formalin-Fixierung etwas gröbere Strukturen zeigt als nach Osmium-Chrom-Fixierung. Ein solcher granulärfädiger Strukturaspekt kann bei *Hyalodiscus* mit allen geprüften Fixationsmitteln nachgewiesen werden. An Hand von Abb. 1 wurde bereits belegt, daß er jedoch nicht der einzig mögliche bei dieser Amöbe ist.

In der vorangehenden Mitteilung in dieser Zeitschrift (Wohlfarth-Bottermann 1960) wurde bereits darauf hingewiesen, daß es bei *Amoeba proteus* bisher in zahlreichen Untersuchungen nicht gelungen war, das Hyaloplasma von *Amoeba proteus* nachzuweisen: Es stellte sich bei verschiedenen Autoren im Dünnschnitt als „elektronenmikroskopisch leerer Raum“ dar, ohne daß irgendwelche Strukturelemente erkannt werden konnten. Die eigenen Untersuchungen zeigten zwar ebenfalls die besondere Schwierigkeit, das

Abb. 6. *Hyalodiscus simplex*. Sagittalschnitte durch den hyaloplasmatischen Lappen („Ektoplasma“). Vorwiegend granulärer Strukturaspekt nach verschiedener Fixation. Abb. 6 a: Osmium-Chrom-Fixierung. Abb. 6 b: reine Osmiumtetroxyd-Fixierung. Abb. 6 c: Osmiumtetroxyd-Fixierung, anschließend Formalin. Abb. 6 d: Formalin-Fixierung, anschließend Osmiumtetroxyd. Elektronenoptisch 14.000 : 1, Endvergrößerung 85.000 : 1.

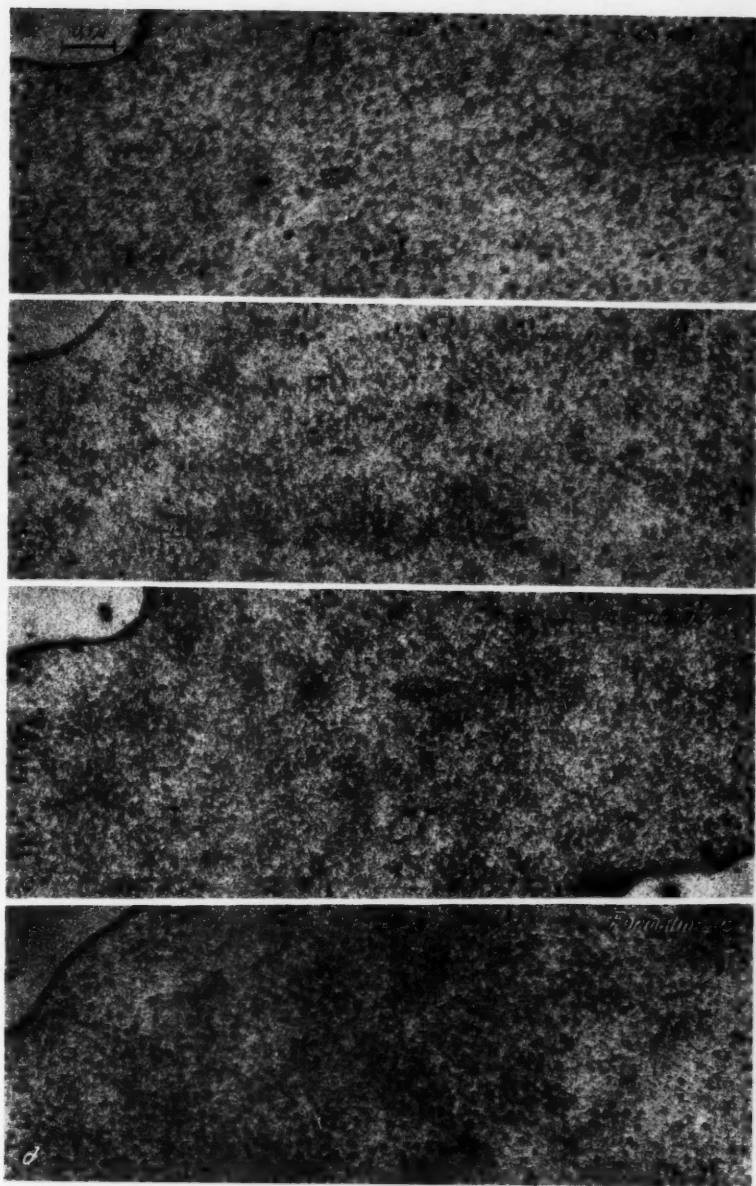


Abb. 6.

Hyaloplasma bei *A. proteus* darzustellen (es ist bei *A. proteus* im Gegensatz zu *H. simplex* schwerer zu lokalisieren und kommt nur in kleineren, im Dünnschnitt schwieriger zu treffenden und zu identifizierenden Zellbereichen vor), bewiesen jedoch, daß dies grundsätzlich möglich ist. Es gelang, seine Feinstruktur ebenfalls nach Einwirkung verschiedener Fixierungsmittel darzustellen und mit den Ergebnissen an *Hyalodiscus* zu vergleichen. Abb. 4 c bildet das Hyaloplasma von *Amoeba proteus* nach reiner Osmiumtetroxyd-Fixation ab. Der Strukturaspekt ist zwar allgemein lockerer als bei *Hyalodiscus*, entspricht jedoch prinzipiell diesem insofern, als auch hier die gleichen Strukturelemente nachweisbar sind: In Abb. 4 c lassen sich besonders an den durch Pfeile markierten Stellen fadenförmige Grundelemente nicht verkennen.

Abb. 5 zeigt eine Gegenüberstellung einer Kombinations-Fixierung (5 a: 1^h reines 10%iges Formalin, nachfolgend 1^h 1% Osmiumtetroxyd) mit dem Osmium-Chrom-Gemisch (5 b) und einer reinen Formalin-Fixierung (5 c). Man könnte den Eindruck haben, daß auf dieser Tafel die Kombinationsfixierung Formalin/Osmium das Cytoplasma am homogensten zur Darstellung bringen würde. Abb. 6 zeigt aber, daß dies nicht der Fall ist. Hier wird in der Gegenüberstellung von vier verschiedenen Fixierern gezeigt, daß ein granulärer Strukturaspekt nicht nur nach reiner Osmiumtetroxyd-Fixierung (6 b) oder einer Kombination von Formalin und Osmium (6 d) oder umgekehrt (6 c), sondern auch nach Anwendung eines Osmium-Chrom-Gemisches (6 a) erzielt wird. Dieser Befund steht mit dem in Abb. 7 gezeigten Ergebnis in Einklang, wonach auch ein fast homogener Strukturaspekt mit allen hier dargestellten Fixierern in Erscheinung treten kann. Hieraus ist der Schluß zu ziehen, daß sämtliche im Rahmen dieser Untersuchung verwandten Fixierer das Cytoplasma überraschend gleichartig zur Darstellung bringen, nämlich in gewissen Hyaloplasma-bereichen entweder homogen, partikulär oder fädig (und dann anscheinend vernetzt). Daß diese drei Möglichkeiten, zwischen denen anscheinend alle möglichen Übergänge existieren, nicht zufälliger oder artefizieller Natur sind, geht aus dem Befund hervor, daß sämtliche genannten Strukturaspekte nicht nur innerhalb einer Fixation, sondern auch auf verhältnismäßig engem Raum nebeneinander innerhalb einer Zelle gefunden werden. Diese lokalen Strukturunterschiede sind also mit größter Wahrscheinlichkeit Hinweise auf das Vorkommen echter, lokaler Differenzen in der Feinstruktur des Grundcytoplasmas im lebenden Zustand. Es liegt sehr nahe anzunehmen, daß sich hier Unterschiede in der dynamischen Aktivität des Hyaloplasmas bei der von mir untersuchten Amöbe widerspiegeln (Wohlfarth-Bottermann 1959, 1960). Das Hyaloplasma (Ektoplasma) der Amöben wird zwar normalerweise im Gegensatz zum „Körnchenplasma“ (Endoplasma) als Plasmagel bezeichnet, es kann jedoch kein Zweifel sein, daß im Rahmen der amöboiden Bewegung lokale Verflüssigungen und Wiederverfestigungen miteinander abwechseln müssen.

Abb. 8 a bis c charakterisieren im Vergleich zu den bisher gezeigten Bildern von *Hyalodiscus* die Feinstruktur des Hyaloplasmas von *Amoeba proteus* nach Fixierung mit Kaliumpermanganat (8 a), Formalin (8 b) und dem Gemisch Osmiumtetroxyd-Kaliumbichromat (8 c). In Rahmen der Be-

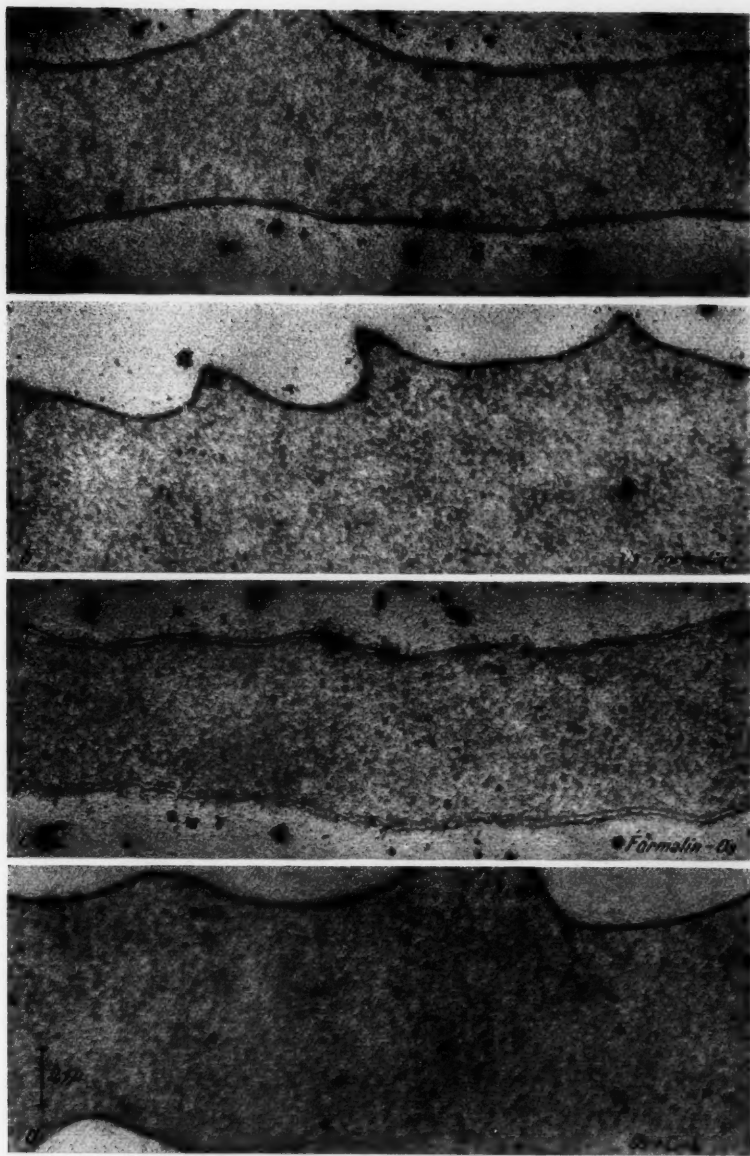


Abb. 7. *Hyalodiscus simplex*. Sagittalschnitte durch den hyaloplasmatischen Lappen („Ektoplasma“). Fast homogener Strukturaspekt nach verschiedener Fixation. Abb. 7 a: Fixierung ausschließlich mit Osmiumtetroxyd. Abb. 7 b: Osmiumtetroxyd-Fixierung, anschließend Formalin. Abb. 7 c: Formalinfixierung, anschließend Osmiumtetroxyd. Abb. 7 d: Osmium-Chrom-Fixierung. Elektronenoptisch 14.000 : 1. Endvergrößerung 90.000 : 1.

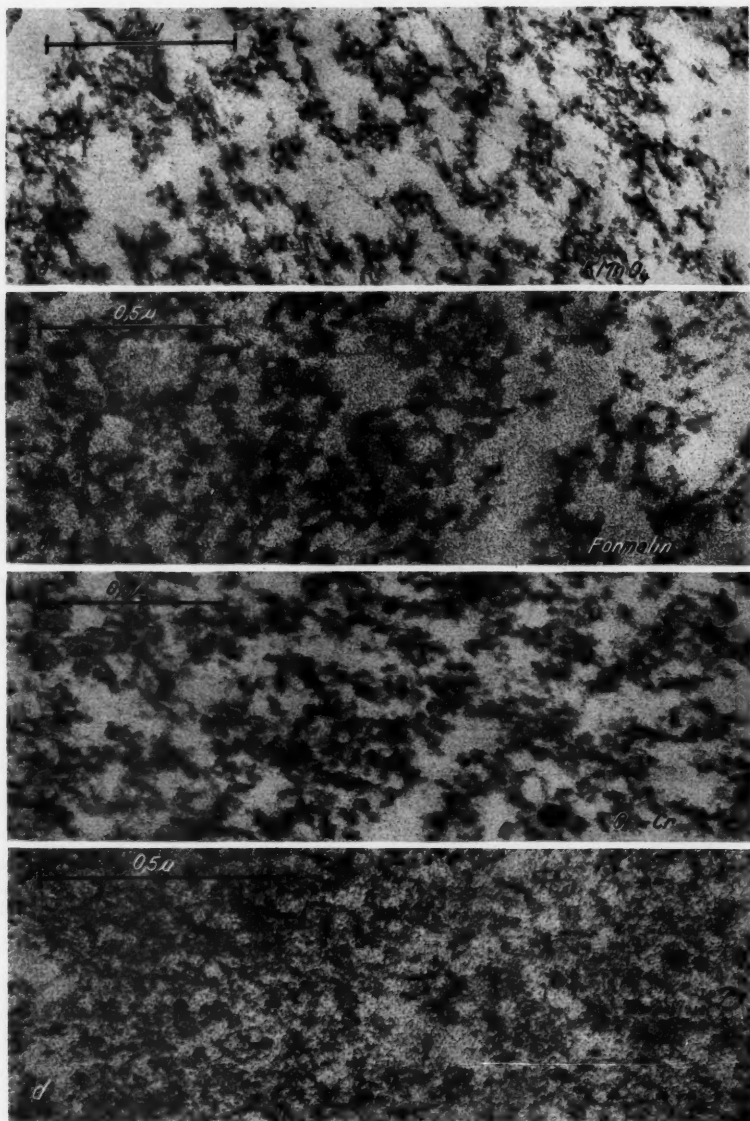


Abb. 8 a bis c. *Amoeba proteus*. Hyaloplasma nach Einwirkung verschiedener Fixierungsmittel. Beachte den sehr viel lockeren Aufbau im Vergleich zum Hyaloplasma von *Hyalodiscus*. Elektronenoptisch 6900 : 1, Endvergrößerung 60.000 : 1. Abb. 8 d: Grundcytoplasma in nichtmyogenen Begleitzellen von Hühnerherzmyoblasten in der Gewebekultur. Osmium-Chrom-Fixierung. Vorwiegend feinfädiger Struktur- aspekt. Elektronenoptisch 6800 : 1, Endvergrößerung 74.000 : 1.

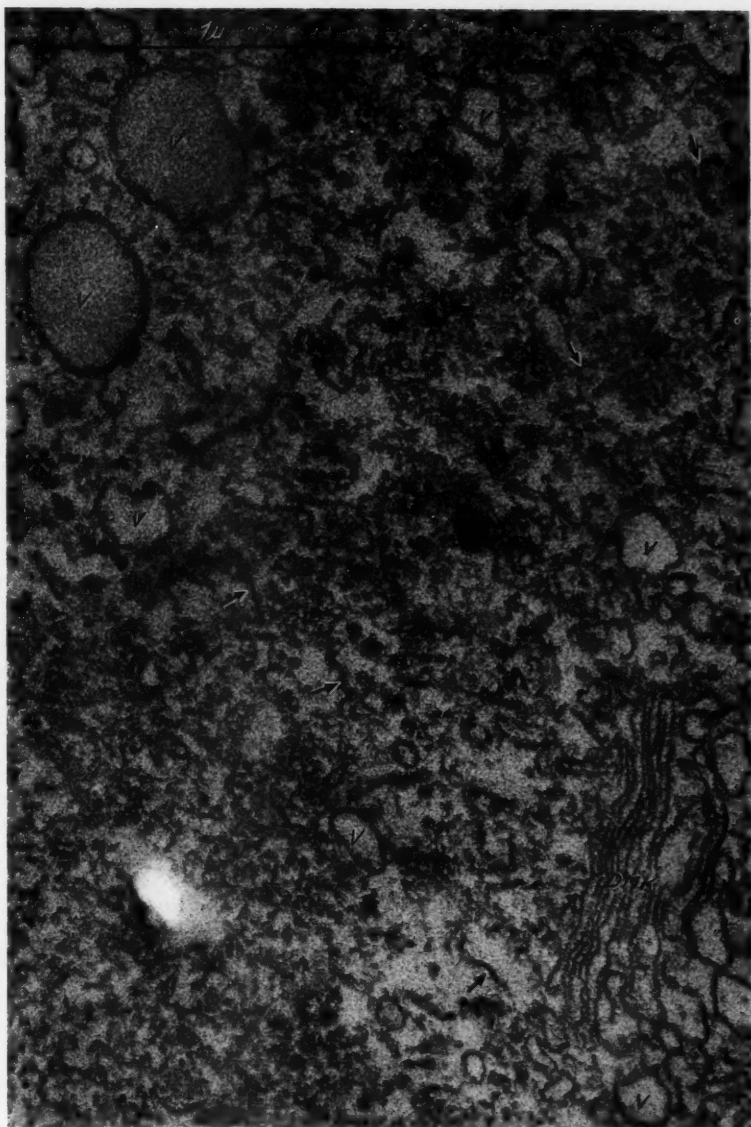


Abb. 9. *Amoeba proteus*. Ausschnitt aus dem Endoplasma. In ein Grundcytoplasma, das in seiner Struktur dem Hyaloplasma von *A. proteus* entspricht (vgl. Abb. 4 c und 8 a bis c), sind vesikuläre Elemente (V) und Membrankomplexe (DMK) eingelagert. Die Pfeile weisen auf Stellen hin, an denen fädige Elemente des Grundcytoplasmas besonders gut zu erkennen sind. Elektronenoptisch 6900 : 1, Endvergrößerung 60.000 : 1.

sprechung von Abb. 4 c (reines Osmiumtetroxyd) wurde bereits erwähnt, daß das Strukturgefüge des Hyaloplasmas dieser Amöbe sehr viel lockerer zu sein scheint als bei *Hyalodiscus*. Besonders auffallend ist auch, daß die Strukturelemente des Hyaloplasmas von *Amoeba proteus* durchweg bei allen geprüften Fixationsmitteln gröber ausfallen als bei der von uns untersuchten Amöbe vom *Limax*-Typ. Ob dies auf wirkliche Unterschiede in der Größenordnung der Strukturelemente hindeutet oder ob die Fixation von *Amoeba proteus* aus unbekannten Gründen weniger gut gelang, muß dahingestellt bleiben. Erwähnenswert ist, daß im Gegensatz zu *Hyalodiscus* ein völlig homogener Strukturaspekt des Hyaloplasmas bei *Amoeba proteus* bisher nicht beobachtet werden konnte. Eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen an *Hyalodiscus* ergibt sich insofern, als auch bei *Amoeba proteus* fadenförmige Strukturen das Hyaloplasma aufbauen, die mit Wahrscheinlichkeit vernetzt sind. Der gleiche Befund läßt sich bei Vestopal-Einbettungen, die ja bekanntlich eine viel schärfere Abbildung kleiner Objektstrukturen als Methacrylateinbettungen ergeben, auch am Grundcytoplasma vieler Zellen höherer Organismen erheben. Als Beispiel ist in Abb. 8 d das Grundcytoplasma nichtmyogener Begleitzellen von Hühnerherzmyoblasten in Gewebekultur (1½ Tage alt) dargestellt. Die Strukturelemente sind kleiner als bei *Amoeba proteus* und *Hyalodiscus simplex*, jedoch ist ihr fadenförmiger Charakter und eine wahrscheinliche Vernetzung nicht zu verkennen.

Bei *Hyalodiscus simplex* ist das Hyaloplasma gleichzeitig die Matrix, die sich auch im Endoplasma, im sogenannten Körnchenplasma, nachweisen läßt, das jedoch dadurch charakterisiert ist, daß hier (abgesehen von den Mitochondrien) zusätzlich „einfache“ Membranstrukturen, vesikuläre Elemente und weiterhin Membranen vorkommen, die morphologisch der Zellmembran entsprechen (Wohlfarth-Bottermann 1960). Im Endoplasma von *Amoeba proteus* (Abb. 9) lassen sich entsprechende Verhältnisse nachweisen. Auch hier besteht ebenso wie bei *Hyalodiscus* das Endoplasma aus vesikulären Elementen (V) und Membranstrukturen (DMK), die in das eigentliche Grundplasma eingelagert sind. Dies Grundplasma, in dem sich fadenförmige Elemente besonders gut an den durch Pfeile markierten Stellen in Abb. 9 nachweisen lassen, entspricht in seinem Strukturaspekt (wie bei *Hyalodiscus*) dem Hyaloplasma von *Amoeba proteus* (vgl. Abb. 9 mit Abb. 4 c). Da die großen vesikulären Elemente im Endoplasma von *Amoeba proteus* ebenso wie bei *Hyalodiscus* (siehe Wohlfarth-Bottermann 1960) von Membranen begrenzt werden, die mit der Zellmembran struktur-

Abb. 10. Gelatine-Gele verschiedener Konzentration und Altersstufen. Osmium-Chrom-Fixierung. Abb. 10 a: Einbettungsmittel Methacrylat, alle anderen Abb.: Vestopal W. Das Gerüst des Gels besteht aus vernetzten fädigen Elementen und wird mit zunehmendem Alter und steigender Konzentration dichter. Präparate: Dipl. Chemiker W. Theimer. Abb. 10 a: Elektronenoptisch 13.800 : 1, Endvergrößerung 65.000 : 1. Abb. 10 b: Elektronenoptisch 6500 : 1, Endvergrößerung 40.000 : 1. Abb. 10 c: Elektronenoptisch 6500 : 1, Endvergrößerung 40.000 : 1. Abb. 10 d: Elektronenoptisch 6500 : 1, Endvergrößerung 40.000 : 1. Abb. 10 e: 6500 : 1, Endvergrößerung 45.000 : 1.

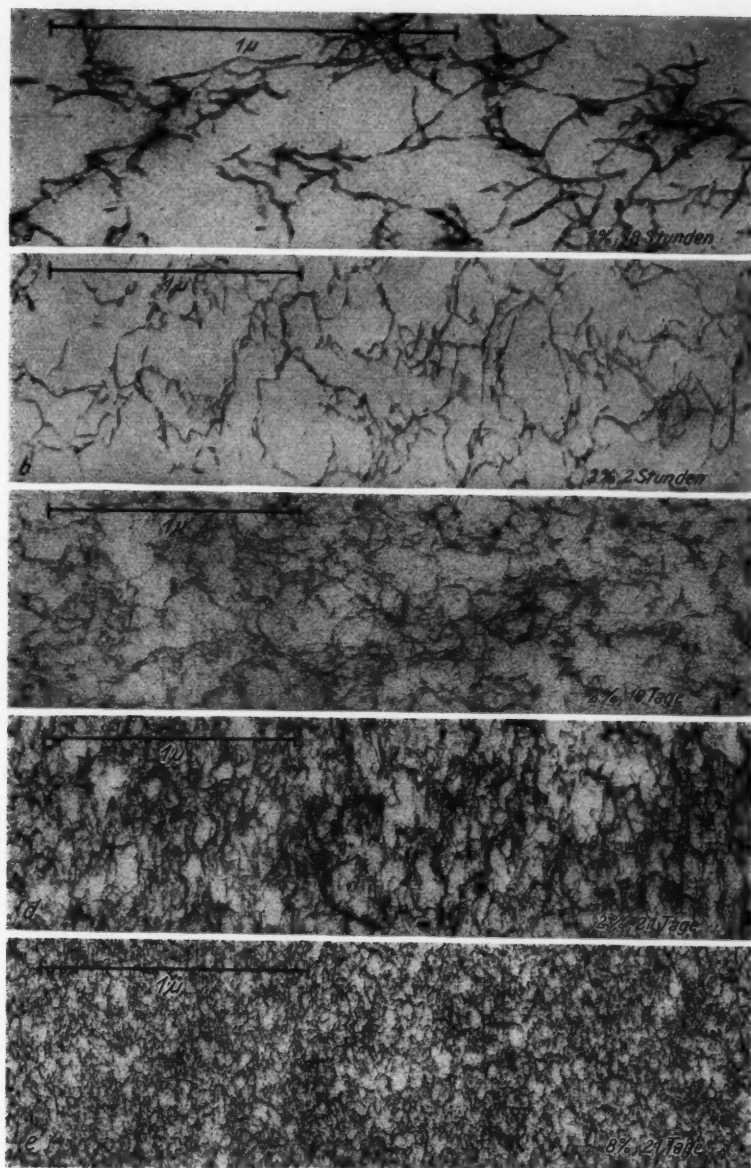


Abb. 10.

gleich sind, liegt es nahe anzunehmen, daß ihre Entstehung — ebenso wie für *Hyalodiscus* bewiesen — auf Pinocytose-Tätigkeit der Zelle zurückgeführt werden kann. Roth (1960) kommt bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen an *Pelomyxa carolinensis* zu dem gleichen Schluß. Die grundsätzliche Gleichheit der beiden hier untersuchten Amöben in bezug auf das charakteristische Strukturgefüge von Hyaloplasma (Ektoplasma) einerseits und Endoplasma andererseits ist auch deshalb wichtig, weil beide Amöben Repräsentanten verschiedener Amöben-Gruppen, nämlich der *Proteus*-Gruppe und der *Limax*-Gruppe sind. In der vorangehenden Mitteilung (Wohlfarth-Bottermann 1960) wurde bereits erwähnt, daß in bezug auf den Bewegungsmodus bei *Hyalodiscus* (*Limax*-Gruppe) ebenfalls eine mehr „schreitende“ Bewegungsweise (wie bei *A. proteus*) festgestellt wurde im Gegensatz zu bisherigen Auffassungen, die eine rollende bzw. fließende Bewegung annahmen. Nachdem nun auch die verschiedenen Cytoplasmamodifikationen bei beiden Repräsentanten dieser Gruppen gleich strukturiert sind, ist es um so mehr berechtigt zu vermuten, daß die grundlegenden Mechanismen, die die amöboide Bewegung bewirken, bei beiden Amöben-Gruppen gleich sind. Dies ist insofern von Interesse, als die elektronenmikroskopische Analyse dieser Vorgänge bei *Hyalodiscus* sehr viel besser durchgeführt werden kann als bei *A. proteus* (vgl. Wohlfarth-Bottermann 1960).

Im Zusammenhang mit der Darstellung des Hyaloplasmagels als pleomorphes Strukturgefüge dürften auch die elektronenmikroskopischen Abbildungen eines besser definierten Gelgerüsts, nämlich von Gelatine-Gelen, in verschiedenen Alters- und Konzentrationsstufen interessieren (Abb. 10 a bis e). Bei Gelatine-Gelen nimmt ja bekanntlich der Gelcharakter mit zunehmendem Alter und steigender Konzentration zu, so daß es von Interesse war, ein besser definiertes Gelgerüst in seinem Verhalten während der gerade genannten Veränderungen zu studieren. Abb. 10 a zeigt fadenförmige Gelstrukturen, die auch schon bei der Konzentration 1% (nach einer Alterung von 18 Stunden) deutlich vernetzt sind. Der Durchmesser der Fäden schwankt zwischen 40 und 125 Å. Mit zunehmendem Alter wird das Netzwerk dichter (Abb. 10 b, c, d), ebenso mit zunehmender Konzentration (Abb. 10 d, e). Auffällig ist, daß der Durchmesser der fadenförmigen Elemente mit dem Alter des Gels nicht zunimmt, eine Zusammenlagerung zu derberen Elementen findet also im Gegensatz zu bisherigen Auffassungen nicht statt. Es scheinen vielmehr während des Alterungsvorganges neue Fäden gebildet zu werden, die das primär entstandene Netzwerk durchsetzen. Der Alterungsvorgang des Gelatine-Gels ist also lediglich eine Fortsetzung der primären Gelation der zum Sol gelösten Gelatine während ihrer Erstarrung. Man muß annehmen, daß im „jungen Gel“ zwischen den bereits ausgebildeten Fadenstrukturen noch gelöste Moleküle vorhanden sind, die bei fortschreitender Gelation im Laufe der Alterung weitere Fadenstrukturen bilden. Entgegen früheren Anschauungen scheinen also die schon vorhandenen Gelstrukturen nicht zu größeren Komplexen zu aggregieren, sondern durch zusätzliche, im Rahmen des Gelierungsprozesses neugebildete Fadenstrukturen durchsetzt zu werden.

IV. Deutung

In Anlehnung an Nissl, Pischinger, Ries, Gersch und Zeiger (vgl. Zeiger 1938) sollte man auch die mit Hilfe des Elektronenmikroskops heute erzielten Abbildungen protoplasmatischer Strukturen in bezug auf ihre „Naturtreue“ mit Hilfe des Begriffs der „Äquivalentbilder“ bewerten. Man könnte dann folgendermaßen klassifizieren:

1. Vitalstrukturen (im Leben in annähernd gleicher Größe und Form präformierte Fixationsstrukturen).

2. Äquivalentstrukturen (vital vorausbestimmte Fixationsstrukturen, die bei bestimmten Eingriffen gesetzmäßig auftreten. Produkte der Mikrotechnik, aber keine Artefakte).

3. Artefaktstrukturen (vital nicht vorausbestimmte Fixationsstrukturen, die bei bestimmten Eingriffen nicht gesetzmäßig auftreten, also keinen oder nur sehr geringen Äquivalentwert besitzen).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, und zwar insbesondere die Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Fixierungsmittel auf das Ektoplasma der Amöbe *Hyalodiscus* erweisen mit aller Deutlichkeit, daß nach chemischer Fixation das Hyaloplasma im elektronenoptischen Sinne bei einer Zellart verschiedene Strukturaspekte besitzen kann. Da diese verschiedenen Strukturaspekte (1. elektronenoptisch homogen, 2. sublichtmikroskopisch granulär und 3. sublichtmikroskopisch fädig-netzig) aber bei den verschiedenen geprüften Fixierungsmitteln erstaunlich gleichmäßig ausfallen⁴, kann geschlossen werden, 1. daß diese Pleomorphie echte, im Leben vorhandene strukturelle Transformationen widerspiegelt und 2. daß der homogene, granuläre und fädige Strukturaspekt einigermaßen glaubhaft ist, das heißt, daß sein Äquivalentwert relativ hoch einzuschätzen sein dürfte. Bei Anwendung der vorstehend definierten „Bewertungsklassen“ dürften die im Rahmen dieser Arbeit vorgelegten Bilder als „Äquivalentstrukturen“ zu bewerten sein.

Das untersuchte Objekt (Amöbe) legt es nahe, daß die elektronenoptisch in Form von „Äquivalentbildern“ nachweisbaren strukturellen Transformationen eine entscheidende Bedeutung im Rahmen der Plasmasol = Plasmagel-Umwandlungen besitzen, auf die die amöboide Bewegung (neuerdings in Verbindung mit ATP-sensitiven Substraten) zurückgeführt wird. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, daß Ts'o und Mitarbeiter (1957) die ATP-sensitive Komponente des Cytoplasmas von Schleimpilzen, das sogenannte Myxomyosin, als Fäden mit einem Durchmesser von 60 bis 80 Å elektronenoptisch abbilden konnten. Berücksichtigt man, daß es sich hierbei um suspendierte, also aufgetrocknete Präparate handelt, bei denen eine relativ starke Schrumpfung angenommen werden muß, so können die „Myxomyosin-Fäden“ mit den hier beschriebenen fadenförmigen Strukturen des Hyaloplasmas von gleicher Größenordnung sein. Nach den Unter-

⁴ Eine Ausnahme bildet die KMnO_4 -Fixation, nach der die Strukturelemente des Hyaloplasmas wesentlich kleiner erscheinen (vgl. Wohlfarth-Bottermann 1960). Amelunxen und Themann (1960) glauben, Hinweise dafür gefunden zu haben, daß diese Erscheinung als artefiziell zu deuten ist.

suchungen von Hoffmann-Berling (1958) kann kein Zweifel daran bestehen, daß das Cytoplasma der Amöben ATP-sensitiv ist. Eigene Untersuchungen über die Wirkung von ATP auf das Hyaloplasma von *Hyalodiscus* haben gezeigt, daß die ATP-Wirkung elektronenmikroskopisch analysierbar ist und mit Formänderungen des hyaloplasmatischen Netzwerkes einhergeht. Es wäre jedoch verfrüht hierüber zu berichten, es soll lediglich darauf hingewiesen werden, daß sich hier interessante Fragestellungen eröffnen (vgl. Bogen 1958).

Der Durchmesser der bei Amöben mit der von uns angewandten Methodik nachweisbaren „globulären“ Elemente schwankt zwischen 50 und 100 Å, der fadenförmigen und anscheinend vernetzten Strukturen zwischen 150 und 200 Å. Man vergegenwärtige sich, daß wir uns also im Größenbereich der Makromoleküle befinden: Der Durchmesser eines Edestin-Moleküls beträgt 80 Å.

De Bruyn (1957) hat auf Grund allgemeiner Überlegungen gefordert, daß das Hyaloplasma-Gel der Amöben aus einem dreidimensionalen Netzwerk von Proteinmolekülen bestehen muß, die miteinander vernetzt sind (vgl. die Haftpunkttheorie Frey-Wysslings). Die hier vorgelegten Bilder des Hyaloplasmas von zwei Repräsentanten der *Limax*- und *Proteus*-Gruppe können vielleicht als erste, einigermaßen lebendnahe Äquivalentbilder des kontraktilellen Gel-Retikulums aufgefaßt werden, an dem der Mechanismus der Plasmasol-Plasmagel-Umwandlung abläuft. Daß dieser Vorgang bei *Hyalodiscus simplex* elektronenmikroskopisch verfolgt werden kann, konnte bereits gezeigt werden (Wohlfarth-Bottermann 1959 b).

Die auf fast allen Aufnahmen sichtbaren, sehr kontrastreichen Partikel mit einem wechselnden Durchmesser von 250 bis 1000 Å treten unabhängig von der angewandten Fixation auf. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür (vgl. Wohlfarth-Bottermann 1960), daß diese, in den verschiedenen Zellen in wechselnder Anzahl auftretenden Partikel eine noch ungeklärte Bedeutung für die Biologie der Amöben besitzen und daher wohl keine reinen Präparationsartefakte darstellen.

Es verbleibt zu diskutieren, inwieweit die hier vertretenen Thesen mit den Befunden anderer Autoren vereinbar sind. In einer früheren Mitteilung (Schneider und Wohlfarth-Bottermann 1959) wurde schon erwähnt, daß keine Übereinstimmung mit den Ansichten von Lehmann (1951) zu erzielen ist. Auch neuere Angaben von Lehmann (1958), wonach die Elemente des Grundplasmanetzes der Amöbe aus „Fibrillen“ mit einem Durchmesser von 15 bis 50 m μ bestehen, in die größere, „chromidienartige Bläschen“ (50 bis 300 m μ) und kleinere, dichtere Granula (15 bis 300 m μ) eingelagert sind, erklären sich wohl durch die besonderen Ansichten dieses Autors über die Fixationstechnik und konnten weder an *Amoeba proteus* noch an *Hyalodiscus simplex* von anderen Autoren bestätigt werden.

Im Größenordnungsbereich der hier zu diskutierenden Strukturen des Hyaloplasmas liegen dagegen die Befunde von Sjöstrand und Rhodin (1953), Rhodin (1954), Wohlfarth-Bottermann (1954), Palade (1955), Sjöstrand (1955), Zetterqvist (1956) an anderen tierischen

Zellen und von Strugger (1956, 1957 a bis c, 1959) und Sitte (1958) an pflanzlichen Zellen. Obgleich es sich hier in allen Fällen um andere Objekte handelt, scheint ihre Berücksichtigung doch angebracht, da die elektronenmikroskopischen Strukturen des Cytoplasmas sowohl bei Tieren als auch bei Pflanzen auffallend gleich gestaltet sind.

Die sogenannte „Cytonemata-Hypothese“ Struggers ist bereits von Sitte (1958) eingehend kritisch beleuchtet worden. Die von Strugger beschriebenen Cytonemata des Grundcytoplasmas sind mit großer Sicherheit identisch mit den RNS-haltigen Palade-Granula, die Sitte (1958) nach einem Vorschlag von Höfler als „Meiosomen“ bezeichnen möchte. Ob es sich bei diesen Gebilden wirklich um schraubenförmige Fäden (Strugger) oder um globuläre Elemente (Sitte und die Mehrzahl der anderen Autoren) handelt, braucht im Rahmen dieser Studie nicht diskutiert zu werden, weil diese Gebilde nur in die cytoplasmatische Matrix eingelagert sind, nicht aber einen regelmäßigen Bestandteil der Grundsubstanz bilden. (Daß zumindest nach Osmiumtetroxyd-Fixation die ribonucleinsäurehaltigen Partikel wenigstens zum Teil als „spiralförmig“ angeordnete Ketten vorkommen können, kann allerdings nicht übersehen werden (vgl. Palade 1955, Watson 1959: Abb. 16 und 17).

Es liegt nahe, daß Wurzelmeristemzellen besonders reich an diesen Trägern der Ribonucleinsäure sind; um so weniger dürften sich solche Zellen allerdings zur Untersuchung der Grundsubstanz des Cytoplasmas eignen. Das gleiche gilt für das ribonucleinsäurereiche Grundcytoplasma des Seeigeleies (vgl. Gross und Mitarbeiter 1960).

Die Frage, ob die sogenannten Palade-Granula (die sich auch bei Verwendung wasserlöslicher Einbettungsmittel nachweisen lassen, vgl. Stäubli 1960), eventuell fädiger oder gar schraubiger Natur sind, ist aber um so offener, als Sjöstrand und Baker (1958) und Hanzon und Mitarbeiter (1959) glauben nachweisen zu können, daß diese Gebilde nicht als 150 bis 300 Å große Partikel in der lebenden Zelle existieren, sondern erst bei jeder Veränderung des inneren Zellmilieus, wie z. B. bei der Homogenisation oder Osmiumfixation, gebildet werden. Nach Gefriertrocknung lassen sie sich nach Angabe der genannten Autoren nicht nachweisen. Hanzon und Mitarbeiter bezeichnen die Palade-Granula deshalb als Artefakte. Obgleich es sich nach den Befunden der genannten Autoren nicht um Vitalstrukturen handelt, die in gleicher Form und Größe im Leben präformiert sind, erscheint mir ihre Bewertung als Artefakte jedoch nicht gerechtfertigt. Man sollte m. E. die Palade-Granula noch als Äquivalentstrukturen bezeichnen, da sie zumindest bei definierten Eingriffen in die Zelle (Homogenisation, Fixierung) gesetzmäßig auftreten. Sie geben uns daher nicht nur wichtige Aufschlüsse über die Lokalisation ribonucleinsäurehaltiger Komponenten, sondern gestatten wohl auch in einem gewissen Ausmaß Hinweise auf ihre Gestalt *intra vitam*, wenn ihr Äquivalentwert nach diesen neuen Befunden auch geringer eingeschätzt werden müßte, als bislang angenommen wurde. Im Gegensatz zu Sjöstrand und Baker (1958) und Hanzon und Mitarbeiter (1960) bilden allerdings Seno und Yoshizawa (1959) Palade-Granula auch nach Anwendung der Ge-

friertrocknung ab, und zwar sogar ohne jede Kontrastierung. Die Frage des Äquivalentgrades der Palade-Granula läßt sich nach diesen einander widersprechenden Ergebnissen der Gefriertrocknung also heute noch nicht beantworten.

Sowohl Strügger als auch Sitte konnten „im Hyaloplasma im elektronenoptischen Sinne“ keine Strukturen nachweisen. Das gleiche gilt für die Arbeiten von Rhodin (1954), Wohlfarth-Bottermann (1954), Zetterqvist (1956) und Rhodin und Dalham (1956). Sjöstrand und Rhodin (1953) und Sjöstrand (1955) fanden „opake Partikel“ mit einem Durchmesser von 40 bis 50 Å, über deren Natur — besonders wohl auch in Anbetracht der zu dieser Zeit noch relativ schlechten Kontrastverhältnisse in den Abbildungen — diesen Autoren keine Aussage möglich schien.

Gross, Philpott und Nass (1960) untersuchten nach zentrifugaler Schichtung des Seeigeleies die „klare Zone“, das heißt das Grundcytoplasma dieser Zellen und kommen auf Grund morphologischer und mechanischer Eigenschaften des Cytoplasmas zu folgendem Schluß: „The ground cytoplasm is a liquid containing a significant concentration of dissolved macromolecular material. The macromolecules should be mainly corpuscular, although they can and do interact. Fibrous and highly cross-linked macromolecules are restricted mainly to the particulate and membranous components of the cell. Suspended in the liquid are large numbers of 16 m μ RNP particles and some vesicles related to the ER. Some of the soluble macromolecules are capable of forming sheets, vesicles, and other condensed systems, perhaps by interaction through phospholipid components, but normally such condensed systems do not contribute significantly to the physical properties of the ground substance in the sea urchin egg.“

Selbstverständlich ist das Grundcytoplasma von Amöben und Seeigeleiern nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar, der Gedanke von Gross und Mitarbeitern (1960), daß die Makromoleküle des Hyaloplasmas fähig seien, lamelläre und vesikuläre Strukturen zu bilden, kann bei *Hyalodiscus* aber experimentell bewiesen werden (Wohlfarth-Bottermann 1959 b). Die von Gross, Philpott und Nass (1960) veröffentlichten Bilder des Grundcytoplasmas des Seeigeleies zeigen vorwiegend nur partikuläre Elemente, die von diesen Autoren aber selbst als „RNS-Partikel“ bezeichnet werden, lassen also eine eigentliche Matrix, in die diese Palade-Granula eingelagert sein müssen, nicht erkennen. Es erscheint also, als ob diese Matrix im Falle eines stark basophilen Grundcytoplasmas völlig homogen wäre, denn die technisch außerordentlich guten Bilder von Blondel und Turian (1960) — es handelt sich hier um das basophile Cytoplasma eines Pilzes nach Einbettung in Vestopal (vgl. insbesondere Abb. 19 dieser Autoren) — erwecken den gleichen Eindruck: Auch hier sind die Palade-Granula („Ribosomen“) in einer cytoplasmatischen Matrix zu finden, die elektronenoptisch völlig homogen erscheint.

Die Befunde an alternden Gelatine-Gelen (Abb. 10) zeigen, 1. daß das hier bei gleicher Technik nachweisbare Eiweißgerüst sich deutlich in Bezug auf seine

Strukturelemente vom Hyaloplasma unterscheidet und 2. daß seine während des Alterns zunehmende Verfestigung in einer fortschreitenden Gelierung eines restlichen Sol-Anteils, also auch in einer Sol \rightarrow Gel-Transformation und nicht in einer Vergrößerung des Gel-Gerüsts im Sinne der Hysteresis-Hypothese besteht. Auch für das Hyaloplasma müssen wir auf Grund der vorliegenden Ergebnisse wohl eher Transformationsmechanismen im Sinne der Neubildung von Faden-elementen unter Durchdringung eines vorhandenen Netzwerkes als nur einen Dimensionswechsel dieses Netzwerkes annehmen.

Zusammenfassend kann wohl festgestellt werden, daß in der bisher vorliegenden Literatur weder bei tierischen noch bei pflanzlichen Zellen Befunde erhoben worden sind, die gegen die hier beschriebene Struktur der cytoplasmatischen Matrix sprechen⁵. Die dreidimensionale Netzstruktur makromolekularer Größenordnung, die sich im Hyaloplasma der Amöben elektronenoptisch u. a. nachweisen läßt, steht jedenfalls mit den aus der Zellphysiologie und Protoplasmatik sich ergebenden Postulaten zur Ultrastruktur der lebenden Substanz in guter Übereinstimmung (vgl. z. B. Zeiger 1943): Allgemeine Erwägungen machen es ohnehin unwahrscheinlich, daß sich das Grundcytoplasma ausschließlich aus globulären Elementen aufbauen kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bekräftigen die Auffassung, daß zwar globuläre Proteine neben fadenförmigen Elementen vorkommen, daß das Protoplasma jedoch immer eine Durchdringungsstruktur beibehält.

Auf eine Diskussion der Ergebnisse in bezug auf die Haftpunkttheorie Frey-Wysslings oder die verschiedenen Theorien der amöboiden Bewegung soll bis zum Abschluß von laufenden Untersuchungen über die experimentelle Beeinflußbarkeit des Hyaloplasmas mit Hilfe von Ionen, ATP und verschiedenen Pharmaka, wie z. B. Heparin und Germanin, die in ganz bestimmter Weise in die Dynamik der Plasmasol \rightleftharpoons Plasmageltransformation eingreifen, verzichtet werden. Der Nachweis „globulärer Elemente“ mit einem Durchmesser von 50 bis 100 Å spricht jedenfalls für das Vorkommen von Sphäroproteinen innerhalb der Grundsubstanz, die möglicherweise durch Aggregation fädige Strukturen bilden können.

Der Nachweis des Umbaus solcher fädiger Strukturen zu laminaren Gebilden (vgl. Wohlfarth-Bottermann 1959 b) läßt es durchaus als möglich erscheinen, daß auch die Transformation von Sphäroproteinen in fädige Eiweißstrukturen elektronenoptisch erkennbar werden wird. Damit könnte das Elektronenmikroskop wesentliche Beiträge zur „molekularen Morphogenese“ plasmatischer Strukturen liefern, nachdem die Hauptfrage, ob die Elemente der Grundsubstanz des Cytoplasmas amikroskopischer oder

⁵ Der von Menke (1957 b und c) geäußerte Verdacht, daß cytoplasmatische Strukturen dieser Größenordnung nicht von Osmiumdioxid- bzw. Urandioxyd-Niederschlägen unterscheidbar seien, ist leicht zu entkräften, wenn man die Kontrastierung formalinfixierter Amöben erst im fertigen Dünnschnitt vornimmt.

sublichtmikroskopischer Größenordnung sind, nun wohl dahingehend beantwortet werden kann, daß beide Möglichkeiten und alle Übergänge zwischen diesen existieren.

Zusammenfassung

1. Die Untersuchung der Grundsubstanz des Cytoplasmas (Hyaloplasma) der Amöben *Hyalodiscus simplex* und *Amoeba proteus* wurde vergleichend mit Hilfe verschiedener Fixierungsmittel (Lipoidstabilisatoren) und verschiedener Fixierkombinationen im Elektronenmikroskop an Hand dünner Schnitte von vestopaleingebetteten Objekten vorgenommen.

2. Die Grundsubstanz des Cytoplasmas tritt bei *Hyalodiscus* in drei verschiedenen Strukturaspekten auf: Sie kann entweder elektronenoptisch strukturlos sein, in einer mehr oder weniger homogenen Struktur globuläre Elemente aufweisen oder aber aus fädigen Strukturen sublichtmikroskopischer Größenordnung bestehen, die mit großer Wahrscheinlichkeit ein Netzwerk bilden.

3. Die oben genannten Variationen im Strukturaspekt lassen sich bei allen geprüften Fixierern, also unabhängig von der speziellen Fixation und von der vorgenommenen zusätzlichen Kontrastierung nachweisen. Die Pleomorphie des Grundcytoplasmas läßt sich auch innerhalb einer Zelle finden.

4. Die Variabilität im Strukturaspekt des Hyaloplasmas von *Hyalodiscus* wird als Ausdruck makromolekularer Transformationen im Rahmen von Plasmasol \rightleftharpoons Plasmagel-Umwandlungen gedeutet.

5. Die Feinstrukturen des Grundcytoplasmas von *Hyalodiscus simplex* (*Limax*-Gruppe) und *Amoeba proteus* (*Proteus*-Gruppe) stimmen prinzipiell überein.

6. Eigene Untersuchungen und Befunde anderer Autoren machen es wahrscheinlich, daß die Grundsubstanz des Cytoplasmas höherer Organismen eine Strukturvariabilität besitzt, die der bei Amöben nachgewiesenen Pleomorphie (sublichtmikroskopisch homogen, granulär und fädig) entspricht.

Literatur

- Afzelius, B. A., 1957: Electron microscopy on the basophilic structure of the sea urchin egg. *Z. Zellforsch.* 45, 660—675.
- Amelunxen, F., 1959: Quantitative Kontrastierungsversuche für die Elektronenmikroskopie. I. Die Kontrastierung des Tabakmosaikvirus mit Osmiumtetroxyd, Kaliumbichromat, Uranyl Nitrat und Uranylacetat. *Z. Naturforsch.* 14 b, 28—32.
- und H. Themann, 1960: Zur Fixation mit Kaliumpermanganat. *Mikroskopie* 14, 276—285.
- Bachmann, L., und P. Sitte, 1959: Dickenbestimmungen nach Tolansky an Ultradünnschnitten. *Mikroskopie* 15, 289—304.
- Bahr, G. F., G. Bloom, and U. Friberg, 1957: Volume changes of tissues in physiological fluids during fixation in osmium tetroxide of formaldehyde and during subsequent treatment. *Exp. Cell Res.* 12, 342—355.

- Bairati, A., und F. E. Lehmann, 1951: Über die Feinstruktur des Hyaloplasmas von *Amoeba proteus*. Rev. Suisse Zool. 54, 445—449.
- Bechold, H., 1929: Die Kolloide in Biologie und Medizin. Steinkopff, Dresden und Leipzig.
- Bernhard, W., A. Gautier und C. Rouiller, 1954: La notion de "microsomes" et le problème de la basophilie cytoplasmique. Arch. d'Anat. microsc. Morph. exp. 43, 236—275.
- Blondel, B., and G. Turian, 1960: Relation between basophilia and fine structure of cytoplasm in the Fungus *Allomyces macrogynus* Em. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7, 127—134.
- Bogen, H. J., 1958: Zellphysiologie und Protoplasmatik. Fortschr. Botanik 20, 130—143.
- Booij, H. L., and H. G. Bungenberg de Jong, 1956: Biocolloids and their interactions. Protoplasmatologia 12; Springer, Wien.
- Brachet, J., 1957: Biochemical Cytology. Academic Press, New York.
- De Bruyn, P. P. H., 1947: Theories of Amoeboid movement. Quart. Rev. Biol. 22, 1—23.
- Engström, A., und J. B. Finean, 1958: Biological ultrastructure. Academic Press, New York.
- Frey-Wyssling, A., 1955: Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. Protoplasmatologia 11 A 2; Springer, Wien.
- 1957: Macromolecules in cell structure. Harvard Univ. Press, Cambridge (Mass.).
- Giese, A. C., 1957: Cell Physiology. Saunders, Philadelphia u. London.
- Goldacre, R. J., 1952: The folding and unfolding of protein molecules as a basis of osmotic work. Int. Rev. Cytol. 1, 135—164.
- und I. J. Lorch, 1950: Folding and unfolding of protein molecules in relation to cytoplasmic streaming, amoeboid movement and osmotic work. Nature 166, 497—500.
- Gross, P. R., D. E. Philpott, and S. Nass, 1960: Electron microscopy of the centrifuged sea urchin egg with a note on the structure of the ground cytoplasm. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. 7, 135—142.
- Haas, J., 1955: Physiologie der Zelle. Bornträger, Berlin.
- Hanson, V., H. Hermodsson, and G. Toschi, 1959: Ultrastructural organisation of cytoplasmic nucleoprotein in the exocrine pancreas cells. J. Ultrastructure Res. 3, 216—227.
- Hoffmann-Berling, H., 1958: Physiologie der Bewegungen und Teilungsbewegungen tierischer Zellen. Fortschr. Zoologie 11, 142—207.
- Kendrew, G. C., 1959: Three-dimensional structure of globular proteins. Rev. Mod. Physics 31, 94—99.
- Lehmann, F. E., 1958: Das Grundplasma tierischer Zellen und seine funktionelle Feinstruktur. Verh. Schweiz. Naturf. Ges. Glarus 139—140.
- Luft, J. H., 1956: Permanganate — A new fixative for electron microscopy. J. Biophys. a. Biochem. Cytol. 2, 799—802.
- Mellors, R. C., 1955: Analytical Cytology. McGraw-Hill, New York.
- Menke, W., 1957 a: Artefakte in elektronenmikroskopischen Präparaten. I. Mitt.: Anisotrope Volumänderungen von Chloroplasten. Z. Naturforsch. 12 b, 654—656.
- 1957 b: Artefakte in elektronenmikroskopischen Präparaten. II. Mitt.: Zur Fixierung von Chloroplasten mit Osmiumtetroxyd. Z. Naturforsch. 12 b, 656—659.
- 1957 c: Artefakte in elektronenmikroskopischen Präparaten. III. Mitt.: Zur Kontrastierung im Uranylacetat. Z. Naturforsch. 12 b, 659—660.

- Menke, W., 1958: Artefakte in elektronenmikroskopischen Präparaten. IV. Mitt.: Dunkelfelduntersuchungen nach Fixierung mit Osmiumtetroxyd. *Z. Naturforsch.* 13b, 187—189.
- Merriam, R. W., 1958: The contribution of lower oxides of osmium to the density of biological specimens in electron microscopy. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 4, 579—582.
- Miller, F., 1959: Orthologie und Pathologie der Zelle im elektronenoptischen Bild. *Verh. dtsh. Ges. Pathol.*; Fischer, Stuttgart; 261—332.
- Monné, L., and S. Hårdé, 1952: Changes in the protoplasmic properties occurring upon stimulation and inhibition of the cellular activities. *Ark. Zoologi* 3, 289—317.
- Niklowitz, W., 1958: Zur Fixierung und Einbettung von Mikroorganismen für die Herstellung ultradünner Schnitte. *Naturwiss.* 45, 167—168.
- Oberling, C., 1959: The structure of Cytoplasm. *Int. Rev. Cytol.* 8, 1—31.
- Palade, G. E., 1952: A study of fixation for electron microscopy. *J. Exper. Med.* (Am.) 95, 285.
- 1954: The fixation of tissues for electron microscopy. *Proc. Int. Conf. Electron Microscopy*, London, 129—142.
- 1955: A small particulate component of the cytoplasm. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 1, 59—68.
- 1958: A small particulate component of the cytoplasm. In: S. L. Paley: *Frontiers in Cytology*. Yale Univ. Press, New Haven.
- Pollicard, A., et C. A. Baud, 1958: Les structures inframicroscopiques normales et pathologiques des cellules et des tissus. Masson, Paris.
- Rhodin, J., 1954: Correlation of ultrastructural organisation and function in normal and experimentally changed proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. *Aktiebolaget Godvil*, Stockholm.
- and T. Dalham, 1956: Electron microscopy of the tracheal ciliated mucosa in rat. *Z. Zellforsch.* 44, 345—412.
- Ries, E., und M. Gersch, 1953: *Biologie der Zelle*. Teubner, Leipzig.
- Roth, L. E., 1960: Electron microscopy of pinocytosis and food vacuoles in *Pelomyxa*. *J. Protozool.* 7, 176—185.
- Seno, S., and K. Yoshizawa, 1959: The fine structure of the cells as revealed by electron microscopic observation on the frozen dried cells. *Naturwiss.* 46, 19—20.
- Schmitt, F. O., 1959: Molecular Biology and the physical basis of life processes. *Rev. modern Physics* 31, 5—10.
- Schneider, L., 1958: Elektronenmikroskopische Analyse von Strahlenschäden im Cytoplasma. 4. Int. Kongr. f. Elektronenmikroskopie, 10.—17. September 1958; Springer, Berlin 1960; 447—479.
- 1959: Neue Befunde über den Feinbau des Cytoplasmas von *Paramecium* nach Einbettung in Vestopal W. *Z. Zellforsch.* 51, 61—77.
- und K. E. Wohlfarth-Bottermann, 1959: Protistenstudien IX. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Amöben unter besonderer Berücksichtigung der Feinstruktur des Cytoplasmas. *Protoplasma* 51, 377—389.
- Schnepf, E., 1960: Zur Feinstruktur der Drüsen von *Drosophyllum lusitanicum*. *Planta* 54, 641—674.
- Siekewitz, P., and G. E. Palade, 1958: A cytochemical study on the pancreas of the guinea pig. II. Functional variations in the enzymatic activity of microsomes. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 4, 401—410.

- Sitte, P., 1958: Die Ultrastruktur von Wurzelmeristemzellen der Erbse (*Pisum sativum*). *Protoplasma* 49, 447—522.
- Sjöstrand, F. S., 1955 a: The ultrastructure of the ground substance of the cytoplasm. In: Fine Structure of Cells, Symp. VIIIth Congr. Cell Biol. Leiden 1954, Int. Union Biol. Sci., Ser. B, Nr. 21, Noordhoff, 222—228.
- 1955 b: The importance of high resolution electron microscopy in tissue cell ultrastructure research. *Science Tools* 2, 25—35.
- 1956: Electron Microscopy of Cells and tissues. In: G. Oster, and A. W. Pollister: Physical techniques in Biological Research 3, 241—298, Academic Press, New York.
- and J. Rhodin, 1955: The Ultrastructure of the proximal convoluted tubules of the mouse kidney as revealed by high resolution electron microscopy. *Exp. Cell Res.* 4, 426—456.
- and R. F. Baker, 1958: Fixation by freezing-drying for electron microscopy of tissue cells. *J. Ultrastructure Res.* 1, 259—246.
- Stäubli, W., 1960: Nouvelle matière d'inclusion hydrosoluble pour la cytologie électronique. *C. r. acad. sci.* 250, 1157—1159.
- Staudinger, H., und M. Staudinger, 1954: Die makromolekulare Chemie und ihre Bedeutung für die Protoplasmaforschung. *Protoplasmatologia* 11; Springer, Wien.
- Strugger, S., 1956 a: Schraubig gewundene Fäden als sublichtmikroskopische Bauelemente des Cytoplasmas. *Naturwiss.* 43, 451—452.
- 1956 b: Die Uranylacetat-Kontrastierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung von Pflanzenzellen. *Naturwiss.* 43, 557—558.
- 1957 b: Schraubig gewundene Fäden als sublichtmikroskopische Strukturelemente des Cytoplasmas. *Ber. dtsh. botan. Ges.* 70, 91—108.
- 1957 b: Die sublichtmikroskopische Struktur des Cytoplasmas im latenten Lebenszustand. *Naturwiss.* 44, 596—597.
- 1957 c: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Plasmodesmen des Wurmeristems der Wurzelspitze von *Allium cepa*; ein Beitrag zur Kritik der Fixation und zur Beurteilung elektronenmikroskopischer Größenangaben. *Protoplasma* 48, 565—567.
- 1957 d: Die sublichtmikroskopische Struktur des Cytoplasmas bei verschiedener Fixation. *Naturwiss.* 44, 543—544.
- und H. Lindner, 1959: Untersuchungen zum Problem der Feinstruktur des Cytoplasmas der Wurzelmeristemzellen von *Allium cepa*. *Protoplasma* 50, 607—626.
- Theimer, W., 1959: Struktur und Alterung von Gelatine-Gelen. *Z. Naturforsch.* 15 b, 546—550.
- Ts'o, P. O., L. Eggman, and J. Vinograd, 1957: Physical and chemical studies on myxomyosin, an ATP-sensitive protein in cytoplasm. *Biochim. Biophys. Acta* 25, 552—542.
- Watson, M. L., 1959: Further observations on the nuclear envelope of the animal cell. *J. Biophys. a. Biochem. Cytol.* 6, 147—156.
- Weissenfels, N., 1957: Elektronenoptischer Nachweis von Schraubenstrukturen im Grundcytoplasma tierischer Zellen. *Naturwiss.* 44, 241—242.
- 1958: Über die Entleerung und Entwicklung der Mitochondrien und den Feinbau des Cytoplasmas von embryonalen Zellen. *Z. Naturforsch.* 13 b, 182—186.

- Wohlfarth-Bottermann, K. E., 1954: Cytologische Studien I. Zur sublicht-mikroskopischen Struktur des Cytoplasmas und zum Nachweis seiner „Partikelpopulationen“. *Protoplasma* 43, 347—381.
- 1956 a: Die Eignung und Anwendung von Phosphorwolframsäure und Thalliumnitrat als Kontrastmittel zur Darstellung cytoplasmatischer Strukturen. *Proc. 1st Europ. Reg. Conf. Electron Microscopy*, September 1956, Almquist u. Wiksell, 124—125. Stockholm, 1957.
 - 1956 b: Protistenstudien VII. Die Feinstruktur der Mitochondrien von *Paramecium caudatum*. *Z. Naturforsch.* 11 b, 578—581.
 - 1957 a: Die Kontrastierung tierischer Zellen und Gewebe im Rahmen ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchung an Ultradünnschnitten. *Naturwiss.* 44, 287—288.
 - 1957 b: Die Eignung und Anwendung von Phosphorwolframsäure und Thalliumnitrat als Kontrastmittel zur Darstellung cytoplasmatischer Strukturen. *Mikroskopie* 12, 74—81.
 - 1958 a: Cytologische Studien II. Die Feinstruktur des Cytoplasmas von *Paramecium*. *Protoplasma* 49, 231—247.
 - 1958 b: Gestattet das elektronenmikroskopische Bild Aussagen zur Dynamik in der Zelle? 4. Internat. Kongr. f. Elektronenmikroskopie, 10.—17. September 1958; Springer, Berlin 1960: 256—258.
 - 1959 a: Cytologische Studien VI. Gestattet das elektronenmikroskopische Bild Aussagen zur Dynamik in der Zelle? *Z. Zellforsch.* 50, 1—27.
 - 1959 b: Die elektronenmikroskopische Untersuchung cytoplasmatischer Strukturen. *Verh. Dtsch. Zool. Ges. in Münster i. W.* 1959. *Zool. Anzeiger*, 393—419.
 - 1959 c: Protistenstudien VIII. Weitere Untersuchungen zur Feinstruktur der Axopodien von Heliozoen. *Zoolog. Anzeiger* 163, 1—10.
 - 1960: Protistenstudien X. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Amöbe *Hyalodiscus simplex* n. sp. *Protoplasma* 52, 58—107.
 - und F. Krüger, 1954: Protistenstudien VI. Die Feinstruktur der Axopodien und der Skelettnadeln von Heliozoen. *Protoplasma* 43, 177—191.
 - und L. Schneider, 1958: Feinstrukturveränderungen bei der Sol \rightleftharpoons Gel-Transformation des Cytoplasmas. *Naturwiss.* 45, 140.
- Zeiger, K., 1958: Physikochemische Grundlagen der histologischen Methodik. *Wissensch. Forschungsberichte, Naturwiss. Reihe*, Bd. 48. Steinkopff, Dresden u. Leipzig.
- 1945: Neuere Anschauungen über den Feinbau des Protoplasmas. *Klin. Wschr.* 22, 201—205.
 - 1958: Probleme der Fixation in Licht- und Elektronenmikroskopie. 4. Internat. Kongr. f. Elektronenmikroskopie, 10.—17. September 1958, Springer, Berlin 1960. 17—26.
- Zetterqvist, H., 1956: The ultrastructural organisation of the columnar absorbing cells of the mouse jejunum. *Aktiebolaget Godvil*, Stockholm.

Professor Dr. Josef Spek 65 Jahre alt

Am 27. Mai 1960 beging Herr Professor Dr. Josef S p e k, Mitbegründer und Herausgeber des „Protoplasma“ und langjähriger Direktor des Zoologischen Instituts der Universität Rostock, seinen 65. Geburtstag.

Josef Spek wurde am 27. Mai 1895 in Sächsisch-Regen (Siebenbürgen) geboren. Nachdem er 1913 in Hermannstadt (Siebenbürgen) seine Reifeprüfung abgelegt hatte, studierte er von 1913—1916 in Heidelberg Naturwissenschaften. Dort promovierte er im Oktober 1916 bei Otto Bütschli „mit Auszeichnung“ und wurde 1918 im Heidelberger Zoologischen Institut Assistent. 1920 habilitierte sich Spek dort bei Curt Herbst. Nach einer mehrjährigen Tätigkeit als Privatdozent in Heidelberg wurde er schon 1925 zum a. o. Professor und 1937 zum Diätenprofessor an der Heidelberger Universität ernannt. In den Jahren 1943 und 1944 leitete er vertretungsweise das Zoologische Institut Greifswald. Seit 1925 unternahm er viele Reisen, die ihn an die großen zoologischen Stationen der Welt führten. So war er Jahre hindurch ständiger Gast der Zoologischen Station Neapel und arbeitete u. a. auch jeweils mehrere Monate in Woods Hole, USA, Rovigno d'Istria, Helgoland und Kristineberg (Schweden). Im Jahre 1947 folgte er gern einem Ruf an die Universität Rostock, um hier seine ganze Kraft dem Wiederaufbau des Rostocker Zoologischen Instituts zu widmen.

Josef Spek ist in der Welt bekanntgeworden durch viele grundlegende Untersuchungen auf dem Gebiet der Protoplasmaforschung und Entwicklungsmechanik. In über 50 wissenschaftlichen Arbeiten und Handbuchbeiträgen hat er vor allem Probleme der Zellteilung, Befruchtung und Furchung sowie der physikalischen Chemie des Protoplasmas, besonders dessen kolloidalen Aufbau eingehend untersucht und beschrieben. Eine Reihe neuer Untersuchungsmethoden und zahlreiche Vitalfarbstoffe sind von ihm in die mikroskopische Technik eingeführt worden.

In den langen Jahren seiner Tätigkeit in Rostock hat Spek in ausgezeichneten Vorlesungen und Praktika nicht nur eine stattliche Zahl von Biologen ausgebildet, sondern auch viele hundert Medizin- und Landwirtschaftsstudenten in die Grundzüge der Zoologie eingeführt. Daneben hat er unermüdlich daran gearbeitet, eine moderne entwicklungs- und zellphysiologische Arbeit am Rostocker Institut zu ermöglichen. Die große Zahl von Diplomarbeiten und Dissertationen auf diesem Gebiet und eigene Veröffentlichungen zeigen, daß seine Bemühungen erfolgreich waren.

Es bleibt zu hoffen und zu wünschen, daß Josef Spek bald von seiner Krankheit genesen möge und ihm noch viele schaffensfreudige Jahre beschieden sind.

E. A. A r n d t (Rostock).

Wissenschaftliche Abhandlungen von Josef Spek

(z. Zt. Rostock, Zoologisches Institut)

Entwicklungsmechanische Arbeiten und Protoplasma-Untersuchungen

1. Oberflächenspannungsdifferenzen als eine Ursache der Zellteilung. Arch. f. Entwmech. **44**, 5—115 (1918).
2. Die amöboiden Bewegungen und Strömungen in den Eizellen einiger Nematoden während der Vereinigung der Vorkerne. Arch. f. Entwmech. **44**, 217—255 (1918).
3. Differenzen im Quellungszustand der Plasmakolloide als eine Ursache der Gastrulainvasion, sowie der Einstülpungen und Faltungen von Zellplatten überhaupt. Kolloidchem. Beihefte **9**, 259—400 (1918).
4. Experimentelle Beiträge zur Kolloidchemie der Zellteilung. Kolloidchem. Beihefte **12**, 1—91 (1919).
5. Studien über den Mechanismus der Gastrulainvasion. Biol. Zentralblatt **39**, 13—23 (1919).
6. Experimentelle Beiträge zur Physiologie der Zellteilung. Biol. Zentralblatt **39**, 23—34 (1919).
7. Der Einfluß der Salze auf die Plasmakolloide von *Actinosphaerium Eichhorni*. Acta zoologica, Stockholm **2**, 153—200 (1920).
8. Über den physikalischen Zustand von Plasma und Zelle der *Opalina ranarum*. Arch. f. Protistenkunde **46**, 166—202 (1923).
9. Neue Beiträge zum Problem der Plasmastrukturen. Ztschr. f. Zellen- und Gewebelehre **1**, 287—326 (1924).
10. Kritisches Referat über die neueren Untersuchungen über den physikalischen Zustand der Zelle während der Mitose. Arch. f. Entwmech. **101**, 444—454 (1924).
11. Über gesetzmäßige Substanzverteilungen bei der Furchung des Ctenophoren-Eies und ihre Beziehungen zu den Determinationsproblemen. Arch. f. Entwmech. **107**, 54—75 (1926).
12. Über den heutigen Stand der Probleme der Plasmastrukturen. Naturwissenschaften **44**, 893—908 (1925).
13. Zu den Streitfragen über den physikalischen Zustand der Zelle während der Mitose. Arch. f. Entwmech. **108**, 525—550 (1926).
14. Über die Winterknospenentwicklung, Regeneration und Reduktion bei *Clapellina lepadiformis* und die Bedeutung besonderer „omnipotenter“ Zellelemente für diese Vorgänge. Arch. f. Entwmech. **111**, 119—172 (1927).
15. Die Struktur der lebenden Substanz im Lichte der Kolloidforschung. Vortrag, geh. am 22. IX. 1928 auf der VII. Versammlung der Kolloid-Gesellschaft. Kolloid-Ztschr. **46**, (1928).
16. Studien an zerschnittenen Zellen. „Protoplasma“ **4**, 321—357 (1928).
17. Zustandsänderungen der Plasmakolloide bei Befruchtung und Entwicklung des *Nereis*-Eies. „Protoplasma“ **9**, 370—427 (1930).
18. Die bipolare Differenzierung des Teleostier-Eies (Kataphorese-Erscheinungen in lebenden Zellen). „Protoplasma“ **18**, 497—545 (1933).
19. Über die bipolare Differenzierung des Eies von *Nereis limbata* und *Chaetopterus pergamentaceus*. „Protoplasma“ **21**, 349—405 (1934).
20. Die Reaktion der Protoplasmakomponenten des *Asterias*-Eies. „Protoplasma“ **21**, 561—576 (1934).

21. Die bipolare Differenzierung des Cephalopoden- und Prosobranchier-Eies. Arch. f. Entwmech. 131, 362—372 (1934).
22. Neues über das pH in der lebenden Zelle und seine Bedeutung für die Zellphysiologie und Zelldifferenzierung. Wissenschaftliche Woche, Frankfurt a. M. 1, 49—53 (1934).
23. Methoden und Aufgaben der Zelloperationen. Deutsche Mediz. Wochenschr. Nr. 47, S. 1896 (1935).
24. Das pH in der lebenden Zelle. Ergebnisse der Enzymforschung 6, (1937).
25. Studien über die Polarität der Larven der Kalkschwämme. „Protoplasma“ 33, (1938).
26. Bemerkungen zu einigen neueren Publikationen über die Differenzierung der Eizelle. „Protoplasma“ 31, (1938) u. 33, (1939).
27. Das pH in der lebenden Zelle. (Vortrag vor der Stuttgarter Tagung der Kolloidgesellschaft). Kolloidzeitschrift 85, (1938).
28. Die Begründer der Zellenlehre und ihr Lebenswerk. Verhandl. des Naturhist.-Mediz. Vereins zu Heidelberg, Verlag O. Winter 18, (1940).
29. Metachromasie und Vitalfärbung mit pH-Indikatoren. „Protoplasma“ 34, (1940).
30. Eine optische Methode zum Nachweis der Lipide in der lebenden Zelle. „Protoplasma“ 37, (1942).
31. Optische Analysen der Vitalfärbung. Jenaische Zeitschrift. f. Mediz. und Naturwissenschaft 77, (1944).
32. Über das optische Verhalten von Safraninen und Aposafraninen in den verschiedenen Komponenten des Protoplasmas. „Protoplasma“ 40, 239—255, (1951).
33. Otto Bütschli (1849—1920). „Protoplasma“ 39, 99—102 (1949).
34. Über das Prinzip der Differenzierung auskeimender Gemmen von *Ephydatia mülleri*. „Protoplasma“ 46, 663—691, (1956).
35. J. Spek und Robert Chambers. Neue experimentelle Studien über das Problem der Reaktion des Protoplasmas. „Protoplasma“, 20, 376—406, (1953).
36. J. Spek und G. Gillissen. Die Zellmembran der Amöben — eine chromotrope Substanz. „Protoplasma“ 37, 258—272, (1943).

Chemische Untersuchungen

1. Die chemische Natur der Statoconien in den Rhopalien von *Rhizostoma pulmo*. Zool. Anzeiger 44, 406—411 (1914).
2. Beiträge zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung und Entwicklung der Radula der Gastropoden. Ztschr. f. wiss. Zoologie 118, 313—363 (1919).

Handbuch- und Lehrbuchbeiträge

1. Methoden der Protoplasmaforschung, in: Methodik d. wiss. Biol., T. Peterfi; J. Springer, Berlin.
2. Die Protoplasmaabewegung. Handb. d. norm. u. path. Physiol. von A. Bethe, VIII. Bd., 1. Hälfte.
3. Die Myoide. Dasselbst.
4. Die Zelle als morphologisches System. 1. Die sichtbaren Zellstrukturen im Lichte der allgemeinen Physiologie, 2. Die physiologischen Wechselwirkungen zwischen Kern und Plasma, in: E. Gellhorns Lehrbuch der allgemeinen Physiologie, S. 433—455. G. Thieme, Leipzig 1931.
6. Allgemeine Physiologie der Entwicklung und Formbildung. Dasselbst, S. 459—602.

Kurze Mitteilungen

Virus-Einschlüsse in *Fritillaria Meleagris* L.

Von

Irmtraud Thaler

Aus dem Institut für Anatomie und Physiologie der Pflanzen, Universität Graz

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. April 1960)

Fritillaria Meleagris, die Schachblume, kommt nach Hegi (1912) in Westeuropa, zerstreut in Mittel- und Südeuropa, mit Ausnahme von Italien und Tirol, ferner auch im Kaukasus vor. In der Steiermark wurde sie erst 1949 im Feistritztal, südwestlich des Dorfes Großsteinbach gefunden (Buschmann 1951).

Sehr viele der in großer Zahl dort vorkommenden Pflanzen besitzen in der Epidermis der Corollblätter, vor allem an der Basis, je eine kleinere oder größere dichte Plasmaansammlung, die den sogenannten x-bodies viruskranker Pflanzen gleichen. Diese Körper liegen entweder in der Nähe des Kernes (Abb. 1), mit ihm meist durch einen Plasmastrang verbunden, oder sie schließen den Kern vollkommen ein (Abb. 2). Der x-body kann durch amöboide Bewegungen — wie sie schon Goldstein (1924) für die x-bodies des Tabaks beschreibt — seine Form verändern. Die in den Epidermiszellen der Blumenkrone überaus lebhaft Plasmaströmung rollt die Einschlusskörper durch die Zelle. Im Innern des x-body sieht man Körnchen in dauernder Brownscher Molekularbewegung. Es bilden sich in seinem Innern auch kleine Kristallnadeln (Abb. 3 und 4); diese fügen sich später unter Verbrauch des x-body zu spindelförmigen Gebilden zusammen (Abb. 5) oder liegen in Häufchen längs der Wand, aber niemals bilden sich

Abb. 1. *Fritillaria*. Teil einer Epidermiszelle. Links Nucleus, rechts x-body.

Abb. 2. *Fritillaria*. Teil einer Epidermiszelle. Nucleus vom x-body umschlossen.

Abb. 3 und 4. *Fritillaria*. Epidermiszellen mit Nucleus und großem x-Körper, der Virusnadeln enthält.



Abb. 1.

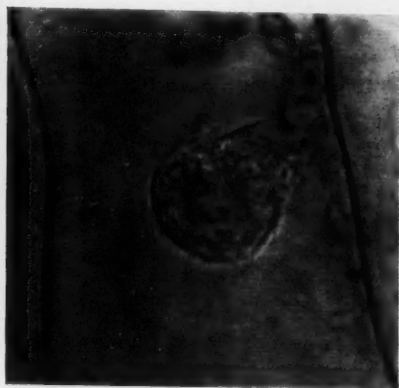


Abb. 2.



Abb. 3.



Abb. 4.

homogene Spindeln, wie sie etwa bei *Schlumbergera* (*Epiphyllum*) vorkommen (Molisch 1885).

Sowohl die x-bodies als auch die Kristallnadeln geben mit Millons Reagens die Eiweißreaktion. Mit dem basischen Farbstoff Coriphosphin fluoreszieren die x-bodies bei pH 4,5 optimal besonders stark in gelber Farbe, ein Zeichen, daß sie Lipide enthalten. Die Kristalle, die im x-body auftreten, leuchten nicht mit diesem Fluorochrom. Im Polarisationsmikroskop zeigen sie schwache Doppelbrechung. Auch die von Bald (1949) angegebene Färbung spricht für die Virusnatur der Einschlusskörper.

Die Färbung wurde in der von Rawlins (1957) abgeänderten Form durchgeführt.

Es wird mit Balds Alkohol-Jod-Formalin 80 Minuten fixiert (2 ccm einer Lösung: 4 g Jod, 6 g KCl, 100 ccm H_2O , 5 ccm absoluten Äthylalkohol, 2 ccm dest. H_2O , 1 ccm Formalin). Nachher in 0,25% Natriumthiosulfat 10 Minuten auswaschen; nachdem die Schnitte die Alkoholreihe hinaufgeführt wurden, werden sie für 15 Minuten in H_2O gegeben und anschließend in einer unverdünnten Giemsa-Lösung 7 Minuten gefärbt. Mit Alkohol und Nelkenöl wird dann differenziert und mit Kanadabalsam eingeschlossen.

Nach dieser Behandlung färben sich nach Rawlins (1957) die Eiweißkristalle und x-bodies ebenso wie der Nukleolus rot, Chromozentren und Zellwände grün bis blau. Genau in gleicher Weise fiel die Baldsche Reaktion bei *Fritillaria* aus. Bekanntlich sind Viruseinschlüsse ebenso wie der Nukleolus reich an Ribonukleinsäure. Es kann wohl angenommen werden, daß die x-bodies und spindelähnlichen Gebilde von *Fritillaria*, die, wie gesagt, sich mit dieser Färbemethode ebenso wie der Nukleolus rot färben, Ribonukleinsäure enthalten. Allerdings ist auch diese Färbung, wie Rawlins (1957) bemerkt, nicht vollkommen spezifisch für Viruseinschlusskörper.



Abb. 5. *Fritillaria*. Teil einer Epidermiszelle. Spindelrig zusammengefügte nadelartige Viruskristalle.

Außer den x-bodies und Kristallen kommen in der Zelle häufig auffallende Inhaltkörper vor, deren Natur nicht geklärt werden konnte. Sie scheinen von einer Hülle umgeben zu sein, die Kallose enthält, da sie mit Anilinblau fluorochromiert im Fluoreszenzmikroskop gelb leuchten. Reich-

liche Kallosebildung kann im übrigen auch als ein Symptom von Viruskrankheiten gelten (siehe Eschrich 1956).

Weißblühende Pflanzen von *Fritillaria Meleagris*, die vereinzelt auf den Wiesen bei Großsteinbach zu finden sind, zeigten in ihren Epidermiszellen auffallenderweise keine x-bodies und keine Spindeln. Auch bei im Versuchsgarten kultivierten käuflich erworbenen *Fritillaria Meleagris*-Pflanzen konnten in den schachbrettartig rotgefärbten Blüten Einschlüsse beobachtet werden, nicht aber in den weißen. In den Blättern und Sprossen wurden x-bodies und Kristalle nie beobachtet.

Die hier beschriebenen Zelleinschlüsse der *Fritillaria*-Pflanzen aus Großsteinbach wurden nicht etwa nur in einer Vegetationsperiode beobachtet, sondern in drei aufeinander folgenden Jahren. Wenn — wie vermutet — diese Inhaltskörper tatsächlich x-bodies und Viruskristalle darstellen, dann wären diese Zwiebelgewächse als ständige, äußerlich meist symptomlose Virusträger aufzufassen. Näheren Aufschluß können nur Infektionsversuche mit geeigneten Testpflanzen geben. Es sind solche Versuche geplant. *Fritillaria* (u. zw. die Spezies *pudica*) gehört zu dem Wirtspflanzenkreis des Virus der „Buntstreifigkeit der Tulpe“ (Klinkowski 1958). Auch bei der Tulpe kann dieser „Krankheitserreger“ ein fast symptomloses Virus sein, oder es ist „color removing“.

Äußere Krankheitssymptome zeigt *Fritillaria Meleagris* im allgemeinen nicht. Nur vereinzelte Exemplare bilden Blüten aus, deren Blätter das charakteristische schachbrettartige Muster mit anthozyanroten Feldern nur ganz undeutlich zeigen. Da Reduktion der Blütenfarbe bei viruskranken Pflanzen nicht selten vorkommt, kann das Verwischen des Musters vielleicht als ein Krankheitssymptom aufgefaßt werden.

Es ist bekannt, daß in Gärten kultivierte Liliaceen öfter von Viruskrankheiten befallen sind. Bei den hier untersuchten Schachblumen handelt es sich aber um Pflanzen eines natürlichen Standortes, der in beträchtlicher Entfernung einer Siedlung gelegen ist. Es ist daher besonders auffallend, daß diese Pflanzen an einer Virose leiden.

Literatur

- Bald, J. G., 1949: A method for the selective staining of viruses in infected plant tissues. *Phytopathology* 39, 395.
Buschmann, A., 1951: Zur Kenntnis von *Fritillaria Meleagris* Linné. *Phyton* 3, 276.
Eschrich, W., 1956: Kallose (Ein kritischer Sammelbericht). *Protoplasma* 47, 487.
Goldstein, B., 1924: Cytological study of living cells of tobacco plants affected with mosaic disease. *Bull. Torrey Bot. Club* 51, 261.
Hegi, G., 1912: *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*. 2. Aufl. Wien.
Klinkowski, M., 1958: *Pflanzliche Virologie*. II. Berlin.
Molisch, H., 1885: Über merkwürdig geformte Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 3, 195.
Rawlins, T. E., 1957: A modification of Bald's stain for viruses and for cell inclusions associated with virus infections. *Phytopathology* 47, 307.

Spindelförmige Inhaltskörper in den Zellen von *Nitophyllum*

Von

Annemarie Ziegler

Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Juli 1960)

Bei Fluorochromierungsversuchen mit Uranin an verschiedenen Rotalgen, die Prof. Höfler von seiner Jugoslawien-Reise zu Ostern 1959 ins Institut mitgebracht hatte, ergaben sich an *Nitophyllum punctatum* einige interessante Beobachtungen. In vielen Zellen, die mit Uranin von pH 4,6 fluorochromiert waren, gab es neben dem grün fluoreszierenden Protoplasma noch zwei auffallend grün leuchtende Pünktchen. Bei näherem Zusehen erwiesen sie sich als Endpunkte eines meist leicht gekrümmten Stäbchens, das in der Längsrichtung der Zelle orientiert dalag. Auch das Stäbchen war mit Uranin grün fluorochromiert, doch leuchteten die beiden Enden besonders stark auf. Neben diesen Stäbchen gab es noch häufig ringförmige Bildungen, wobei die Ringe meist nicht geschlossen waren (siehe Abb. 1). Auch U-Schleifen und spiralig gewundene Spindeln waren zu sehen. Diese Inhaltskörper liegen unter den Plastiden. Wenn man eine Zelle mit Hilfe der Mikrometerschraube von oben nach unten durchtastet, liegen zuoberst die Plastiden im Wandbelag der Zelloberseite, bei etwas tieferer Einstellung werden die Inhaltskörper sichtbar und bei noch weiterem Drehen der Mikrometerschraube bekommt man die Plastiden der Zellunterseite zu sehen. Die Zellen der wachsenden Scheitelregion waren stets frei von Inhaltskörpern, erst in den weiter rückwärts zu liegenden, älteren Zellen traten sie auf und zwar in verschiedenen Thallusstücken mit unterschiedlicher Häufigkeit. Manchmal enthielt jede ältere Zelle einen Inhaltskörper, in anderen Thallusstücken waren sie hingegen nur sehr spärlich vorhanden oder fehlten gänzlich. Neben inhaltskörperführenden Pflanzen gab es auch solche, die keine Spur von ihnen zeigten.

Die Mehrzahl der Inhaltskörper war glatt und an den Enden mehr oder weniger schräg abgeplattet oder zugespitzt, vereinzelte aber faserten an den Enden auf (vgl. Weber und Kenda 1951, Abb. 2) oder erschienen als Ganzes aufgelockert und aus Einzelfasern zusammengesetzt.

Die spiralig und ringförmig eingerollten Inhaltskörper schnellten beim Durchsaugen von 96%igem Alkohol, einer zusammengedrückten Stahlfeder vergleichbar, auseinander und streckten sich, soweit es die Zelllänge zuließ, gerade. Meist lagen sie nachher einer Zellängswand an.

Bei den beschriebenen Inhaltskörpern handelt es sich wohl um Eiweißspindeln, wie sie ähnlich auch in verschiedenen Cacteen (Molisch 1885, Gicklhorn 1913, Weber, Kenda und Thaler 1952), aber auch bei *Oncidium* (Mikosch 1890), bei *Impatiens* (Küster 1948), *Valerianella* (Weber 1940, Thaler 1954) und einigen anderen Blütenpflanzen auftreten. Auch von *Vaucheria* sind Eiweißspindeln bekannt (Molisch 1926). In vielen Fällen (z. B. Kakteen) erwiesen sich diese „Spindel-Träger“ auch als „Virus-Träger“. Das Virus kann dabei latent sein, dann ist die Pflanze ein äußerlich symptomloser Virusträger; es kann aber auch stärker virulent

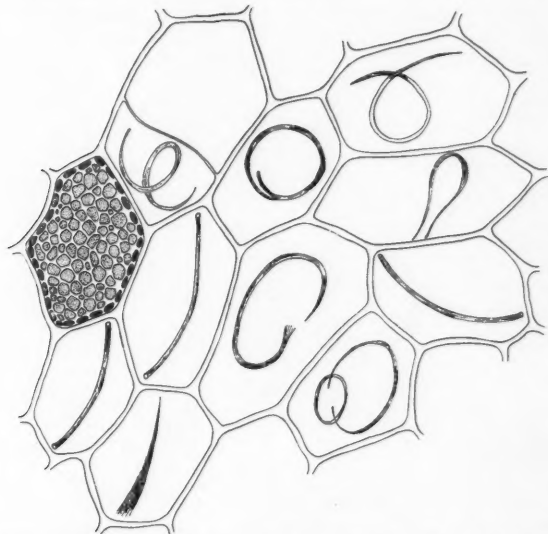


Abb. 1. *Nitophyllum punctatum*, spindelförmige Inhaltskörper.

sein, dann werden die Symptome der Virose auch äußerlich erkennbar (Weber 1954). Bei *Drosera*, *Impatiens* und *Valerianella* scheint es sich nach Webers Ansicht aber nicht um symptomlose Virusträger zu handeln. Die Inhaltskörper dürften hier eher ein zytoplasmatisches Gattungsmerkmal (Thaler 1954) darstellen, da sie sich in allen untersuchten Pflanzen zu jeder Jahreszeit allgemein verbreitet fanden.

Ob es sich bei den Spindeln von *Nitophyllum* etwa um die Folge einer Virusinfektion handelt oder nicht, müßte erst durch Untersuchungen einer Reihe von Pflanzen am natürlichen Standort geklärt werden. Für eine Virusinfektion spricht allerdings, daß nicht alle Pflanzen Eiweißspindeln haben und daß diese auch in einzelnen Thallusstücken in verschiedener Häufigkeit auftreten. Es wäre dies wohl das erste in marinen Algen vorkommende Virus.

Die Algen wurden in Gläsern im Kaltwasserbecken des Instituts weiterkultiviert. Bei einer Durchsicht des Materials nach zwei Monaten fanden sich nur mehr wenige unveränderte Spindeln. Die Mehrzahl der Inhaltskörper bestand jetzt nur mehr aus einem dünnen „Docht“ zu dessen beiden Seiten

je eine Reihe kleiner stark lichtbrechender Tröpfchen lag. Die Abstände der Tröpfchen untereinander sowie ihr Abstand vom Docht waren ziemlich konstant. In vereinzelter Fällung bestand der Docht aus mehreren nebeneinanderliegenden Fasern oder es lagen nur mehr zwei Parallelreihen von Tröpfchen in der Zelle und vom Docht war nichts mehr zu sehen (Abb. 2).

Daß es sich beim Auftreten dieser Inhaltskörper nicht um einen Einzelfall handelte, zeigte das im heurigen Frühjahr von Prof. Höfler aus Neapel mitgebrachte Algenmaterial. Sowohl an *Nitophyllum punctatum* als auch an *Nitophyllum micropunctatum* (F u n k 1955) konnten die Spindeln und Ringe wieder beobachtet werden. Auch in diesem Material gab es spindel-freie und spindelführende Pflanzen. Die Spindeln traten dabei in den ein-

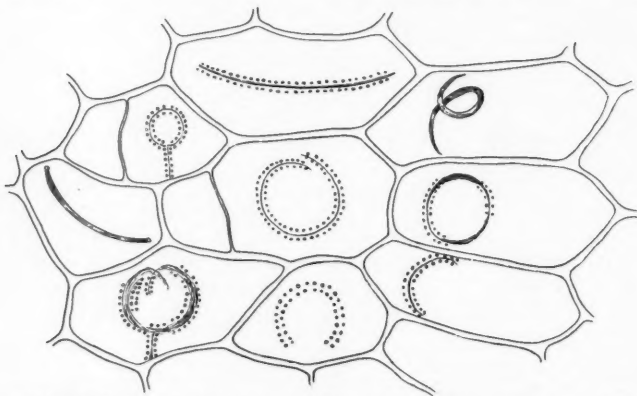


Abb. 2. *Nitophyllum punctatum*, spindel-förmige Inhaltskörper zum Teil bereits aufgelöst.

zelnen Thallusabschnitten ein und derselben Pflanze wieder mit unterschiedlicher Häufigkeit auf, die Scheitelregion war jedoch stets frei von Inhaltskörpern.

Literatur

- F u n k, G., 1955: Beiträge zur Kenntnis der Meeresalgen von Neapel. Pubbl. Staz. zool. Napoli 25.
- G i c k l h o r n, J., 1913: Über das Vorkommen spindelförmiger Eiweißkörper bei *Opuntia*. Österr. bot. Z. 63, 8.
- K ü s t e r, E., 1948: Über die Eiweißspindeln von *Impatiens*. Biol. Zbl. 67, 148.
- M i k o s c h, C., 1890: Über ein neues Vorkommen geformten Eiweißes. Ber. deutsch. bot. Ges. 8, 33.
- M o l i s c h, H., 1885: Über merkwürdig geformte Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. Ber. deutsch. bot. Ges. 3, 195.
- 1926: Pflanzenbiologie in Japan auf Grund eigener Beobachtungen. Jena.
- T h a l e r, I., 1954: Eiweißspindeln von *Valerianella*. Österr. bot. Z. 101, 566.
- W e b e r, F., 1940: Eiweißspindeln von *Valerianella*. Protoplasma 34, 148.
- 1954: Sind alle Pflanzen mit Cytoplasma-Eiweißspindeln Virusträger? Phyton 5, 189.
- und G. K e n d a, 1951: Cactaceen-Virus-Eiweißspindeln. Protoplasma 41, 111.
- — 1952: Die Viruskörper von *Opuntia subulata*. Protoplasma 41, 378.
- — und I. T h a l e r, 1952: Viruskörper in Kakteen-Zellen. Protoplasma 41, 277.

Referate

Handbuch der allgemeinen Pathologie. Herausgegeben von F. Büchner, E. Letterer, F. Roulet. Zehnter Band, erster Teil: Strahlung und Wetter. Bearbeitet von H. Fritz-Niggli, G. Miescher, B. de Rudder, F. Schwarz und H. U. Zollinger. Mit 283 Abb., IX, 434 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1960. Ganzl. DM 180.—. Bei Verpflichtung zur Abnahme des gesamten Handbuches Subskriptionspreis DM 144.—.

Der vorliegende Band enthält fünf Beiträge. — Im ersten behandelt H. Fritz-Niggli die allgemeine Strahlenbiologie. Wie die Autorin selbst schreibt, war es nicht möglich, der außerordentlich zahlreichen strahlenbiologischen Literatur voll gerecht zu werden. Physikalische Erläuterungen über das Wesen der ionisierenden Strahlen sind den Darstellungen der biologischen Probleme vorangestellt. Die Reaktion von Pflanzen und Zellen hängt nicht allein von der Strahlendosis, sondern von deren Entwicklungs- und Funktionszustand, außerdem von Milieufaktoren ab. Die Strahlenwirkung auf die Zelle außerhalb und während der Zellteilung mit Darstellung der Chromosomenschäden an sich und im Zusammenhang mit Umweltfaktoren wird abgehandelt. Natürlich ist den genetischen Schädigungen breiter Raum eingeräumt, wobei auch die Methode zur Aufdeckung von Mutationen, vor allem rezessiver, im erbbiologischen Experiment berücksichtigt sind. — Ein weiteres Kapitel betrifft den Einfluß ionisierender Strahlen auf die Entwicklung. Die Wirkung ist um so intensiver, je größer die Vermehrungstätigkeit ist. Interessant sind die Ergebnisse über Beeinflussung der Regeneration. Diese wird im Experiment bei erhaltener Vitalität zerstört. — Ein besonderes Kapitel gilt der kanzerogenen Wirkung ionisierender Strahlen bei verschiedenen Applikationsarten (äußerlich und innerlich mit Isotopen). Strahlengeschwüre und Leukämie sind mit einbezogen. Die experimentellen Beobachtungen der Literatur sind tabellarisch zusammengefaßt. — Weitere Kapitel behandeln das Strahlensyndrom bei Tier und Mensch. Die Erfahrungen von Hiroshima und Nagasaki sind erwähnt. Von besonderem Interesse sind die Mitteilungen über Strahlenschutz: Abdecken der Milz, Injektion von Extrakten unbestrahlter Organe (Milz, Knochenmark), Implantation von Nebenniere. Hier hätte dem R. E. S. und weichen Bindegewebe, wie den strahlenbedingten Störungen in den vegetativen Regulationen wenigstens mit einigen Hinweisen Rechnung getragen werden müssen (der Ref.). Bezüglich der Vermehrung fremder Zellen im bestrahlten Wirtstier ist nur neuere Literatur berücksichtigt. — Den Abschluß bilden die biochemischen Strahlenwirkungen vor allem auf Fermente (Verdünnungs- und Schutzeffekt) und endlich die direkte und indirekte strahlenbiologische Theorie.

Der zweite Beitrag über Radio-Histologie und Radio-Histopathologie von H. U. Zollinger beginnt mit grundsätzlichen Erörterungen über ionisierende Strahlen und Gewebe. Es ist nicht gleichgültig, welches Material bestrahlt wird, in welchem Zustand und Milieu es sich befindet, außerdem in welcher Form die Bestrahlung erfolgt. — Folgend werden die Reaktionen der verschiedenen Gewebe und der Organe pathologisch-histologisch aus-

föhrlich untersucht und behandelt. Wichtig erscheinen in Hinblick auf die präventive Bestrahlung vor Tumoroperationen die Erörterungen (einschließlich der Problematik) einer Beeinflussung von Entzündung und Wundheilung durch ionisierende Strahlung. (Thorotrastschäden sind berücksichtigt.) — Ein letztes Kapitel behandelt das Problem Strahlen und Krebs vorwiegend vom pathologisch-histologischen Standpunkt. Zum Schluß wird über die Strahlensensibilität und die Strahlenprognose maligner Tumoren diskutiert. Vorbestrahlungen, Charakter des Tumors, genetische Konstitution und allgemeine Kondition des Tumorträgers werden hier gewürdigt.

Der dritte Beitrag von G. Miescher behandelt die Biologie und Pathologie des sichtbaren, ultraviolett-infraroten Lichtes. Die Wirkung auf lebende Substanz beruht einerseits auf photochemischen Umsetzungen, andererseits auf der durch Absorption entstehenden Wärme. Der quantenproportionale photochemische Effekt nimmt gegen die längerwelligen Bereiche ab, die kalorische hingegen zu. Der photodynamische Effekt entsteht durch die Lichtabsorption. Entsprechend der Eintrittspforte in den Organismus, beschäftigt sich der Beitrag hauptsächlich mit den Reaktionen der Haut auf die verschiedenen Lichtarten, mit der Gewöhnung, mit der Abhängigkeit der Lichtreaktion von der Konstitution und äußeren Einflüssen. — Die photodynamischen Wirkungen des Lichtes werden von den verschiedensten, auch histologischen Standpunkten aus beleuchtet. Ein weiteres Gebiet sind die photoallergischen Phänomene (ekzematoide und urticarielle), Lichtkrebs, Lichtwirkung auf das Auge (Konjunktiva, Linse), auf Mikroorganismen und allgemeine Lichteinwirkungen (Rachitis, Kreislauf, Atmung, Blut, Stoffwechsel, Endokrines System, Allgemeinbefinden, Infektionsabwehr).

Ein vierter Beitrag von F. Schwarz behandelt die Veränderungen am menschlichen Körper durch den elektrischen Strom. Hier wird nicht nur das Physikalische, sondern im Zusammenhang damit auch das Zustandekommen der Schäden (elektrischer Widerstand der Gewebe) behandelt. Es folgen dann bis ins Mikroskopische gehende Darstellungen der äußeren und inneren Schäden und Zerstörungen durch Niederspannungen, Hochspannungen und Blitzschlag. Der Artikel bezieht sich nicht nur auf pathologisch-anatomische, sondern auch auf klinische und forensische Belange. Zahlreiche praktische Beispiele mit anschaulichen Bildern bereichern die Darstellungen.

Der letzte Beitrag von B. de Rudder beschäftigt sich mit dem Einfluß des Wetters, von Jahreszeit und Klima als pathologische Faktoren über die alltäglichen Belange hinaus. Der Autor geht von Begriffsdefinitionen und meteorologisch-geophysikalischen Erörterungen aus. Der biotrope Wetterfaktor ist bisher noch nicht endgültig geklärt, doch läßt sich heute schon sagen, daß der Reaktionsträger im Körper in erster Linie das vegetative Nervensystem ist. (Vielleicht wäre es besser, hier allgemein vom „vegetativen System“ zu sprechen — der Ref.)

Die verschiedenen Methoden zur Ermittlung der Korrelationen und die Schwierigkeit dabei werden besprochen (Statistik von Unfällen, Tod, Geburt, Schmerzanfälle, Blutdruck usw.).

Die Häufigkeit vieler Erkrankungsformen mit den „biologischen“ Jahreszeiten geht parallel (statistisch-rechnerische und physiologische Analysen). Auch den Mechanismus der jahreszeitlichen Wirkungen (Saisonfaktor) versucht der Autor zu erfassen. Es ist weniger die Temperatur, als die über die Augen, den Optikus und Hypothalamus im intermediären Stoffwechsel zur Auswirkung kommende Lichtmenge (hyperthalamische Optikuswurzel). Weiters wird das Klima behandelt, vor allem in epidemiologischer Hinsicht. Zum Schluß bleibt die Erkenntnis, daß wir über direkte Klimaeinflüsse auf Krankheitsvorgänge nur sehr wenig wissen. Der Artikel bringt zwar eine Menge einschlägiger Beobachtungen, wirft aber mit Hinweisen auf heilklimatische Erfahrungen, auf Klima als Erholungsfaktor und dessen Wir-

kung auf die vegetativ gesteuerte Kreislaufstruktur und auf das Befinden von Patienten bei z. B. Asthma und Gelenksrheumatismus eine Menge an Problemen auf.

Im Gesamten hält der Band die Höhe der bisher erschienenen Bände; die Beiträge sind sorgfältig auf Basis einer großen Literatur abgefaßt, auch wenn man da und dort neueste Arbeiten vermißt.

Druck und Ausstattung sind ausgezeichnet.

A. Pischinger (Wien).

Buchner, P.: Tiere als Mikrobenzüchter. 1.—6. Tausend. Verständliche Wissenschaft, Band 75, Naturwissenschaftl. Abt. Mit 102 Abb., VIII, 160 S. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1960. Ganzl. DM 8.80.

Der 75. Band der Reihe „Verständliche Wissenschaft“: „Tiere als Mikrobenzüchter“, ist, vielleicht ungewollt, eine Jubiläumsschrift, insofern als in ihm ein Überblick über die Ergebnisse von 50 Jahren Symbioseforschung gegeben wird. Es gibt wohl keinen Berufeneren als Paul Buchner, eine solche verständliche Zusammenfassung über das Symbioseproblem zu schreiben, hat er doch selbst, vom entscheidenden Beginn der Symbioseforschung (1909 und 1910) an, durch eigene Untersuchungen und durch Arbeiten zahlreicher seiner Schüler größten Anteil an einer Reihe von Entdeckungen. Mit ihm wurde die Symbioseforschung in dem abgelaufenen halben Jahrhundert zu einem neuen, außerordentlich reizvollen Kapitel der biologischen Wissenschaft. Die vorliegende Darstellung ist allgemein verständlich abgefaßt und führt uns alle grundlegenden Tatsachen und Probleme aus dem Gebiet der Symbioseforschung, die bis in die jüngste Zeit aufgezeigt werden konnten, vor Augen. Zunächst wird ein sehr aufschlußreicher historischer Überblick und eine kurze Zusammenfassung über die schon frühzeitig entdeckten Algensymbiosen bei Wassertieren gegeben. Das eigentliche, viel mannigfaltigere Gebiet der Symbiosen finden wir bei Landtieren. Sie zeigen als Wirte überraschende Anpassungen an ihre Gäste, die sich aus Bakterien und niederen Pilzen rekrutieren. Behandelt werden aber auch die temporären Endosymbiosen der pilzzüchtenden Termiten, Blattschneiderameisen, Borkenkäfer, Holzwespen u. a. Insekten. Die erblichen Endosymbiosen werden so dargestellt, daß wir die fortschreitende Vertiefung, die immer weitergehende Einverleibung der Symbionten in den Wirtsorganismus verfolgen können. Ein geradezu spannendes Geschehen offenbart sich uns bei der Schilderung der mannigfaltigen Übertragungsweisen und der Entstehung eigener Übertragungsformen von Symbionten. Die erblichen Endosymbiosen sind lebensnotwendige Bündnisse, die nie mehr unterbrochen werden. Allmählich wird klar herausgestellt, daß bestimmte Zusammenhänge zwischen Endosymbiosen und Ernährungsweisen bestehen. Holz- bzw. Zellulosefresser, Pflanzensaftsauger, Blutsauger, sobald sie in ihrer gesamten Entwicklung auf diese einseitige Kost angewiesen sind, besitzen Symbionten. Die experimentelle Symbioseforschung hat den Beweis für die Lebensnotwendigkeit der Vitamine und Wachstumsstoffe liefernden Symbiosen erbringen können. Anwendung von überoptimaler Wärme, von Antibiotika oder Sulfonamiden führte zur Sterilisierung der Symbiontenträger. Es zeigte sich, daß sie ohne ihre Symbionten nicht lebensfähig sind. Erstaunlich weit sind auch die Einblicke, die uns in die phylogenetische Entstehung der Symbiosen gegeben wird. Die vergleichende Behandlung der Symbiose, im Verein mit der Vorstellung vom Stammbaum der Wirte und die Kenntnis der Symbiosen einiger Reliktformen, läßt nämlich gewisse sichere Schlüsse auf die phylogenetische Entwicklung der Symbioseverhältnisse zu.

Wer, wie Paul Buchner, ähnlich wie Wessenberg-Lund, ein Leben lang immer in engstem Kontakt mit der lebenden Natur und den beobachtbaren

Tatsachen der Biologie geblieben ist, wird es verstehen, daß er das Staunen und die Ehrfurcht vor der Schöpferkraft der Natur nicht verlernt hat. Daß uns Paul Buchner in dem vorliegenden Bändchen seine gefühlsmäßige Einstellung zu diesen Fragen und Problemen nicht vorenthalten hat, macht es uns noch besonders wertvoll. Nicht vergessen sei die reiche, gute Weiterbildung, — 102 Abbildungen im Text —; die das Vorgetragene wesentlich anschaulicher und verständlicher machen. Die Ausstattung ist der der schon vielfach bewährten übrigen Bände dieser wertvollen Reihe ebenbürtig.

F. Schremmer (Wien).

Stauff, J.: Kolloidchemie. Mit 294 Abb., VIII, 744 S., Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag 1960. Ganzl. DM 69.—.

Das vorgelegte Werk ist (neben einem kleineren Buch von Jirgensons und Straumanis 1949) seit längerer Zeit wieder das erste ausführliche Lehrbuch der Kolloidchemie (oder, wie es fast mit mehr Recht heißen könnte, der Kolloidphysik). Es unterscheidet sich von manchem älteren Werk dadurch, daß die Phänomenologie etwas in den Hintergrund tritt und dafür die Darstellung der theoretischen Grundlagen und ihrer mathematischen Behandlung den breitesten Raum einnimmt. Daneben werden auch die Bestimmungsmethoden für charakteristische Größen von Kolloiden sehr sorgfältig geschildert und erklärt, soweit es sich um das Grundsätzliche handelt. Zahlreiche Zitate vermitteln jeweils den Anschluß an die Spezialliteratur.

Die Darstellung beginnt mit einigen „klassischen“ Kapiteln: Auf eine allgemeine Einführung folgen Abschnitte über die physikalischen Eigenschaften dispersions-invariabler Systeme und über die Bestimmung der Größe, Gestalt und Struktur kolloidaler Partikeln. Daran schließt sich die Behandlung speziellerer Themen: „Grenzflächenerscheinungen“, „Elektrische Erscheinungen in kolloidalen Systemen“ und „Dispersionsvariable Systeme“. Endlich werden die verschiedenen Arten von Kolloiden bearbeitet: Dispersionskolloide, Assoziationskolloide, Makromoleküle und Makroionen sowie die Gele. Ein theoretisch-physikalischer Anhang beschließt das Buch.

Der Leser hat den Eindruck eines soliden, mit deutscher Gründlichkeit geplanten und durchgeführten Werkes von reichem didaktischen und informativen Gehalt. Obwohl es mehr für Physiker und Chemiker geschrieben zu sein scheint, wird es sicherlich auch der physikochemisch orientierte Biologe gerne und mit Erfolg zu Rate ziehen.

H. Kinzel (Wien)

Bei der Schriftleitung sind folgende weitere Arbeiten eingelangt:

Biebl, R., W. Uri und Gertrude Janeček: Untersuchungen über chemischen Strahlenschutz an Pflanzenzellen	3. 5. 1960
Horie, K.: The Behavior of the Petals in the Opening of the Flowers of <i>Tradescantia reflexa</i>	14. 5. 1960
Olszewska, Maria J.: Recherches autoradiographiques sur la formation du phragmoplaste	23. 5. 1960
Olszewska, Maria J.: L'effet du β -mercaptoéthanol et de l'urée sur la structure du phragmoplaste	28. 5. 1960
Straus, W.: Studies on Chromoplasts of Carrot.	10. 6. 1960
Werth, W.: Vergleichende Untersuchungen über die relative Permeabilität des Protoplasmas für Alkohol und Wasser	27. 6. 1960
Käppner, W.: Bewegungsphysiologische Untersuchungen an der Amöbe <i>Chaos chaos</i> L. (II. Die Wirkung von Salyrgan, Cystein und ATP) . . .	14. 7. 1960
Kinzel, H., und R. Imb: Über Vitalfärbung stark saurer Zellsäfte und eine Methode zur pH-Bestimmung in vivo	15. 7. 1960
Kenda, Griseldis: Einschlusskörper in den Epidermiszellen von <i>Chlorophytum comosum</i>	20. 7. 1960
Schneider, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Strahlen auf das Cytoplasma. (I. Die Frühwirkungen von Röntgenstrahlen auf das Cytoplasma von <i>Paramecium</i>)	20. 8. 1960
Schneider, L.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Wirkung von Strahlen auf das Cytoplasma. (II. Die Spätwirkung von Röntgenstrahlen auf das Cytoplasma von <i>Paramecium</i>)	20. 8. 1960
Sitte, P.: Zum Bau der Plastidenzentren in Wurzelproplastiden	28. 8. 1960
Parker, J., und D. E. Philpott: An Electron Microscopic Study of Chloroplast Condition in Summer and Winter in <i>Pinus strobus</i>	28. 8. 1960
Klima, J.: Elektronenmikroskopische Studien über die Feinstruktur der Trikladen (<i>Turbellaria</i>)	8. 9. 1960
Milličić, D., und Z. Udjinac: Virus-Eiweißspindeln der Kakteen in Lokalisationen von <i>Chenopodium</i>	15. 9. 1960
Klima, J., und R. Jarosch: Das Characeen-Protoplasma und seine Inhaltskörper. II. (Elektronenmikroskopischer Befund)	20. 9. 1960
Blochingner, A.: Die Wirkung cancerogener und östrogenen Stoffe auf Pflanzen	22. 9. 1960
Falke, D., und J.-E. Richter: Phasenkontrastmikroskopische Befunde zur Bildung mehrkerniger Kulturzellen.	8. 10. 1960
Kamiya, N.: Protoplasmaströmung	28. 10. 1960
Wohlfarth-Bottermann, K. E.: Cytologische Studien VIII. Zum Mechanismus der Cytoplasmaströmung in dünnen Fäden	31. 10. 1960
Campbell, A. D., und W. D. Seward, Th. E. Gilmer, Jr. und E. G. Huf: Automatic Recording of Electric Potential and Ion Transport in Frog Skin	15. 12. 1960
Jarosch, R., und O. Kiermayer: Spirochaeten im Rhizopodenplasma	24. 12. 1960
Kinzel, H., und Erika Bolay: Über die diagnostische Bedeutung der Entmischungs- und Fällungsformen bei Vitalfärbung von Pflanzenzellen	16. 1. 1961

SPRINGER-VERLAG IN WIEN

Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe
Progress in the Chemistry of Organic Natural Products
Progrès dans la chimie
des substances organiques naturelles

Herausgegeben von

L. Zechmeister

California Institute of Technology, Pasadena USA

Zuletzt erschien:

Band XVIII: Mit 65 Abbildungen. X, 600 Seiten. Gr.—8°. 1960.

S 594.—, DM 99.—, sfr. 101.40, \$ 23.55

Ganzleinen S 618.—, DM 103.—, sfr. 105.50, \$ 24.50

Inhaltsverzeichnis: Brockmann, H., Die Actinomycine. — Paller, M., Natürlich vorkommende Nitroverbindungen. — Thoai, N. van et J. Roche, Dérivés guanidiques biologiques. — Kjær, A., Naturally Derived Iso Thiocyanates (Mustard Oils) and Their Parent Glucosides. — Völker, O., Die Farbstoffe im Gefieder der Vögel. — Zechmeister, L., Cis-trans Isomeric Carotenoid Pigments. — Brian, P. W., J. F. Grove and J. MacMillan, The Gibberellins. — Williams, J. W., Selected Subjects in Sedimentation Analysis, with Some Applications to Biochemistry. — Heidelberger, M., Structure and Immunological Specificity of Polysaccharides. — Namen- und Sachverzeichnis.

Archiv für die gesamte Virusforschung

Begründet von R. Doerr

Herausgegeben von S. Gard, Stockholm, C. Hallauer, Bern, K. F. Meyer, San Francisco
E. G. Nauck, Hamburg, A. B. Sabin, Cincinnati

Schriftleitung: C. Hallauer, Bern

Zuletzt erschien:

Band X, Heft 4. (Abgeschlossen im Oktober 1960.) Mit 45 Textabbildungen. 151 Seiten.
1961.

S 228.—, DM 38.—, sfr. 38.90, \$ 9.05

Inhaltsverzeichnis: Verilinde, J. D., J. B. Wilterdink and R. P. Mouton, Presence of Two Interfering Enteroviral Agents (ECHO Virus Type 9 and Poliovirus Type 2) in the Human Central Nervous System. — Pette, H., G. Maass, L. Valenciano und K. Mannweiler, Zur Frage der Neuropathogenität von Enteroviren. — Wenner, H. A., Te-Yong Lou and P. S. Kamitsuka, Experimental Infections with Coxsackie Viruses I. — Te-Yong Lou, H. A. Wenner and P. S. Kamitsuka, Experimental Infections with Coxsackie Viruses II. — Plácido de Sousa, C., and J. F. D. Ferreira, Multiplication of Herpes Virus in a Mouse Mammary Tumor. — Gifford, G. E., Manometric Measurement of a Cell-Virus Relationship. — Duncan, I. B. R., Human Thyroid Tissue Culture in Diagnostic Virology. — Thormar, H., Stability of Viana Virus in Infectious Tissue Culture Fluid. — Cantell, K., Production and Action of Interferon in HeLa Cells. — Bloedhorn, H., und R. Ackermanns, Untersuchungen zur Wärmostabilität des Virus der Zentraleuropäischen Encephalitis. — Mahnel, H., Tierexperimentelle Untersuchungen mit Vakzine-Antigen. — Szathmáry, J., Studies on the Non-specific Inhibition by Some Body Fluids against Vaccinia Haemagglutination.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

